



PC/FR 2004/000354

27 FEV. 2004

REC'D 28 MAY 2004

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

29 JAN. 2004

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 0 W / 030103

REMISE DES PIÈCES DATE 14 MAI 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0305768 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 14 MAI 2003		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 240589 D20701 BF			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) MICROORGANISME A ACTIVITE METHIONINE SYNTHASE MODIFIEE ET PROCEDE DE PREPARATION DE LA METHIONINE.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation FRANCE Date 18-02-2003 N° 0301924 Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		METABOLIC EXPLORER	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		423703107	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	BIPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE, FR	
	Code postal et ville		
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page

Reçue à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

14 MAI 2003

LIEU

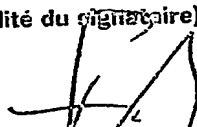
75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0305768

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 030103

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		240589-BF
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75017 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG [] [] [] [] [] []
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
 92-1001		M. ROCHET

Microorganisme à activité méthionine synthase modifiée et procédé de préparation de la méthionine

5 La présente invention se rapporte au domaine de la bioconversion et d'obtention d'acides aminés par fermentation de microorganismes. Elle se rapporte à une méthode de criblage et d'évolution dirigée permettant d'identifier une souche de microorganisme, éventuellement génétiquement modifié, possédant une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée, ladite souche produisant de l'acide 2-
10 Amino-4-(alkylmercapto)butyrique, en particulier de la L-méthionine (acide 2-Amino-4-(méthylmercapto)butyrique). L'invention concerne également la souche de microorganisme, les enzymes améliorées et à leurs séquences codantes. L'invention concerne enfin un procédé de préparation de la méthionine par culture de ladite souche de microorganisme.

15 La DL-Méthionine est produite industriellement par synthèse chimique. Le méthyl-mercaptan réagit avec l'acroléine pour produire le β -méthylthiopropionaldéhyde, qui réagit avec l'hydrogène cyanide pour produire l' α -hydroxy- γ -méthyl-thio-butyro-nitrile. Après traitement avec l'ammoniac, et une hydrolyse, on obtient la méthionine.

20 Tous les producteurs industriels de la DL-méthionine utilisent les mêmes matières premières à savoir l'acroléine, le méthane thiol (méthyl-mercaptan), l'hydrogène cyanide et l'ammoniac ou l'ammonium carbonate. Le procédé de synthèse du mélange racémique peut être conduit en batch ou en continu.

25 Un procédé industriel combine à la synthèse chimique de la biocatalyse par l'utilisant l'acétyl-coA synthase, enzyme produite par *Aspergillus oryzae* pour obtenir uniquement la L-méthionine à partir de la DL-méthionine.

30 Les brevets US 6,379,934 et EP 1 055 730 se rapportent à la production d'acides aminés en utilisant une souche de bactéries corynéformes, dans laquelle le gène *accBC* est amplifié. La méthionine est mentionnée, mais seule la préparation de L-lysine est exemplifiée.

 Toutefois, la synthèse d'acides aminés soufrés culture de microorganisme reste difficile à mettre en œuvre à des niveaux susceptibles de conduire à une

exploitation industrielle, notamment du fait de la complexité de leurs voies de biosynthèse et de nombreux mécanismes de régulation.

En effet, le métabolisme de la méthionine, est fortement régulé, la régulation de son métabolisme se faisant à plusieurs niveaux (Weissbach et al., 1991, Mol.

5 Microbiol., 5, 1593-1597) :

- métabolisme carboné pour la fabrication de la L-sérine à partir du glycerate3P, de la L-homosérine à partir de l'aspartate et de l'acétyl-CoA
- métabolisme du soufre pour la fabrication de la L-cystéine à partir de la L-sérine, de l'acétyl-CoA et du sulfate du milieu de culture
- 10 - synthèse de la méthionine (Fig. 1) à partir de la L-homosérine, de la cystéine et d'acétyl-CoA ou succinyl-CoA.

La demande WO 93/17112 décrit les différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse de la méthionine à partir de l'acide L-aspartique dans divers organismes. Cette demande de brevet décrit également l'introduction dans un microorganisme de
15 plusieurs gènes exogènes agissant de manière séquentielle pour la synthèse de la méthionine, employant du méthyl-mercaptop ou du sulfure d'hydrogène comme source de soufre.

La présente invention se rapporte à des souches de microorganismes en
20 particulier des bactéries, notamment *E. coli* et les corynébactéries, produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I)



dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou des groupe(s) hydroxy,
25 ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrrolyle, pyrazolyle, triazolyle, tetrazolyle, thiazolyle, ou thienyle,

par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :

30 R'-SH (II)

dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,

les dites souches présentant au moins une un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée.

Par enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée, on entend selon l'invention toute enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides 2-amino-4-
5 (alkylmercapto)butyriques de formule générale (I) par conversion d'un substrat dérivé de formule générale (III)



dans laquelle R'' représente un radical acyle de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

10 soit par conversion directe du substrat en acide de formule générale (I),
soit par conversion du substrat en homocystéine de formule générale (IV)



laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une enzyme appropriée.

15 Les enzymes à activité « méthionine synthase » modifiée sont des enzymes modifiées par rapport aux enzymes natives pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) au lieu de la réaction catalysée par l'enzyme native. Cette modification, appelée encore mutation,
20 consiste essentiellement en ce que l'enzyme modifiée ait une plus grande affinité pour le composé soufré de formule générale (II) que pour son co-substrat naturel.

Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un microorganisme, d'une bactérie en particulier. On entend désigner notamment les
25 différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose.

Par sel physiologiquement acceptable, on entend selon l'invention les sels du
30 composé de formule générale (I) qui n'affectent pas le métabolisme et la capacité de croissance de la souche de microorganisme selon l'invention, notamment les sels de métaux alcalins comme le sodium.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, en particulier choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, i-butyle ou t-butyle. De manière plus préférentielle, R représente le radical méthyle.

5 L'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I) obtenu est de préférence la L-méthionine.

L'utilisation d'une source de carbone simple et d'un composé soufré de formule (II) pour la production d'acide de formule (I) par bioconversion présente *a priori* plusieurs avantages, notamment :

- la synthèse de l'acide (I), comme la méthionine, en une ou deux étapes à partie à partir d'O-acyl-L-homosérine, devient indépendante de la synthèse de la cystéine voire également du cycle du tétrahydrofolate ;
- les composés soufrés de formule (II), comme le méthyl-mercaptan, qui sont des matières premières généralement toxiques issues de la pétrochimie, peuvent être valorisés dans la synthèse d'acides aminés à haute valeur ajoutée.

L'invention est basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de l'activité « méthionine-synthase » de la cystationine- γ -synthase (EC 4.2.99.9 ; GenBank AAN83320, ou AAA24167) en présence de méthyl-mercaptan. Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metB* chez *E. coli* (Fig. 2) et *C. glutamicum*, présente une activité pour un large spectre de substrats (Flavin, M. ; Slaughter, C. (1967) Enzymatic synthesis of homoserine or methionine directly from O-succinyl-homoserine. *Biochim. Biophys. Acta* 132: 400-405).

25 L'invention est aussi basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de l'activité « méthionine-synthase » de l'O-acétyl-L-homosérine sulphydrolase (ou O-acétyl-L-homosérine sulphydrylase, C 4.2.99.10) en présence de méthylmercaptan. Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metY* chez *C. glutamicum* (Genbank AF220150), présente une activité pour un large spectre de substrats (Smith DK, Thompson JF. (1969) Utilization of S-methylcysteine and methylmercaptan by methionineless mutants of *Neurospora* and the pathway of their conversion to methionine. II. Enzyme studies. *Biochim Biophys Acta* 184(1):130-8).

L'invention concerne donc également un procédé de préparation des souches selon l'invention et leur utilisation dans un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I), de préférence de la L-méthionine.

Le procédé de préparation de souches selon l'invention consiste à obtenir, à partir d'une souche bactérienne initiale, une souche bactérienne génétiquement modifiée présentant au moins une modification dans un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase », ledit procédé comprenant une étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne initiale à une pression de sélection en présence du composé de formule (II) défini ci-dessus, afin de diriger une évolution dudit gène codant pour ladite enzyme à activité « méthionine synthase » dans ladite souche bactérienne, vers un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée par rapport à ladite souche bactérienne initiale.

Une activité « méthionine synthase » est améliorée dans la souche (A) de microorganisme par rapport à la souche (I) initiale lorsque la production de méthionine dans les mêmes conditions de culture (dans un milieu contenant une quantité efficace de dérivé soufré de formule (II)) est supérieure pour la souche (A) que pour la souche (I). Cette amélioration est préférentiellement observée par étude de la quantité de méthionine produite. Dans certains cas, on peut observer cette amélioration par l'augmentation du taux de croissance de la bactérie (A) par rapport au taux de croissance de la bactérie (I), dans un milieu minimum ne contenant pas de méthionine.

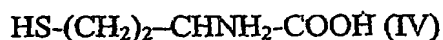
La présente invention concerne également les souches à activité « méthionine synthase » améliorée susceptibles d'être obtenues par le procédé de sélection selon l'invention et comprenant au moins un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie précédemment et ci-après.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée permet la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I). Dans ce cas, la source de soufre est un

composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente le radical R défini précédemment.

L'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est choisie parmi les cystathionine- γ -synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases.

- 5 Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée permet la conversion du substrat de formule générale (III) en homocystéine de formule générale (IV)



- laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une
10 enzyme appropriée. Dans ce cas, la source de source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente un atome d'hydrogène, préférentiellement du sulfure d'hydrogène. La source de soufre H₂S peut-être introduite dans le milieu de culture ou bien être produite par la bactérie à partir d'une source de soufre simple, par exemples un sulfate.

- 15 L'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est avantageusement choisie parmi les cystathionine- γ -synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases.

- L'homme du métier saura sélectionner d'autres enzymes à activité « méthionine synthase » modifiée en fonction de leur capacité à évoluer pour effectuer la réaction enzymatique « méthionine synthase » modifiée telle que définie
20 précédemment. On citera notamment les cystéines synthases A et B, codées par les gènes cysK et cysM chez les bactéries.

Pour les cystathionine- γ -synthases modifiées définies précédemment et ci-dessous, le substrat est avantageusement la O-acétyl-L-homosérine ou la O-succinyl-L-homosérine, de préférence la O-succinyl-L-homosérine.

- 25 Pour les acylhomosérine sulfhydrylases modifiées définies précédemment et ci-dessous, le substrat est avantageusement la O-succinyl-L-homosérine ou la O-acétyl-L-homosérine, de préférence la O-acétyl-L-homosérine.

- Pour ces deux enzymes, la modification consiste essentiellement en une mutation de manière à ce que la transformation du substrat de formule générale (III)
30 se fasse de manière préférentielle avec le composé de formule générale (II) plutôt qu'avec la L-cystéine.

La mutation des enzymes peut être obtenue par la mise en œuvre du procédé de préparation de souches à activité « méthionine synthase » améliorée selon

l'invention par culture sous pression de sélection en présence du composé de formule générale (II).

Dans ce cas, le gène comprenant la séquence codant pour la cystathionine- γ -synthase ou l'acylhomosérine sulfhydrylase est

- 5 ◦ soit un gène natif, présent dans le génome de la souche initiale (I) où il est exprimé pour permettre la traduction de l'enzyme correspondante,
- soit un gène hétérologue comprenant une séquence codant pour une cystathionine- γ -synthase ou une acylhomosérine sulfhydrylase, sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression et sa traduction dans la
- 10 souche initiale (I) où il aura été introduit.

La mutation peut également être obtenue par mutagenèse dirigée,

- soit directement sur le gène natif présent naturellement dans la souche initiale (I), notamment par recombinaison homologue,
- soit par des techniques usuelles de mutagenèse dirigée sur des séquences codant
- 15 pour une cystathionine- γ -synthase ou une acylhomosérine sulfhydrylase, introduite ensuite dans la souche initiale (I) sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression et sa traduction dans ladite souche initiale (I) où il aura été introduit.

- 20 De tels éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier, et comprennent des séquences de régulation promotrice, ou promoteurs, en particulier des promoteurs dits promoteurs forts constitutifs chez les microorganismes. De préférence, le promoteur fort constitutif est choisi parmi pTAC-O (SEQ ID N° 1), pLAC-O (SEQ ID N° 2), pTRC-O (SEQ ID N° 3), pTHLA (SEQ ID N° 4),
- 25 promoteurs forts pour lesquels l'opérateur lac a été délété pour les rendre constitutifs.

- 30 De manière avantageuse, les cystathionine- γ -synthases « initiales » ou à activité « méthionine synthase » non modifiée sont sélectionnées parmi les cystathionine- γ -synthases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence CPG0626.

Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection

d'alignements de sequences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures connues de protéines.

5 Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi d'identifier des domaines conservés anciens.

10 De manière préférentielle, la cystathionine- γ -synthase est la cystathionine- γ -synthase de E. coli K12, représentée sur la SEQ ID NO : 6, et les séquences homologues de cette séquence présentant une activité cystathionine- γ -synthase et comprenant au moins 80% d'homologie, préférentiellement 90% d'homologie, plus préférentiellement 95% d'homologie avec la séquence d'acides aminés de la SEQ ID
15 NO 6.

Les moyens d'identification des séquences homologues et de leur pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment le programme BLAST, et notamment les programme BLASTP, qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres
20 indiqués par défaut sur ce site.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la cystathionine- γ -synthase initiale, avant modification, comprend une séquence d'acide aminés ci-dessous dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

25 dans laquelle

X1 représente A,G,S, de preference A

X2 représente E,V,P,T, de preference E

X3 représente S,T,N, de preference S

X4 représente G,D,A,H,T, de preference G

30 X5 représente V,A,T,H,N, de preference V

X6 représente E,R,K,F, de preference E

X7 représente S,T, de preference S

X8 représente L,I,V,A, de preference L et

25 Les positions des acides aminés employées ci-dessus et ci-après sont
entendues comme étant des positions relatives faites par référence à la séquence de
cystathionine-γ-synthase de *E. coli* K12. L'homme du métier saura bien entendu
retrouver les acides aminés correspondants sur d'autres séquences de cystathionine-γ-
synthases, par l'emploi d'outils usuels d'alignement de séquences. On citera
30 notamment le programme BLAST, qui peut être utilisé à partir du site
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce
site. L'alignement de séquence pourra être effectué tant au niveau de la protéine (SEQ

ID NO 6) que de sa séquence codante, comme par exemple la séquence codante représentée sur la SEQ ID NO 5.

On peut aussi avantageusement utiliser la recherche avancée de BlastP en affinant la recherche avec un motif (PHI-BLAST). Dans ce cas on pourra prendre le motif [AGS]-[EVPT]-[STN]-L-G-[GDAHT]-[VATHN]-[ERKF]-[ST]-[LIVA]-[IVAT] pour une première zone conservée et le motif x(2)-Y-[SATPG]-R-x(2)-[NHQS]-[PDL]-[TMNGS]-[RLVSWE] pour une deuxième zone conservée où les lettres indiquées en gras correspondent aux acides aminés majoritairement présent à cette position dans la séquence, et où x correspond à n'importe quel acide aminé. Le chiffre 2 entre parenthèse signifie qu'il y a deux acides aminés indéterminés.

Pour l'alignement des séquences, on peut utiliser les programmes CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

Un tel alignement de séquences est représenté sur la figure 5 pour une sélection de différentes cystathionine- γ -synthases.

Elles sont de préférence choisies parmi les cystathionine- γ -synthase (CGS) suivantes :

- Q9ZMW7 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, *Helicobacter pylori*
- 20 P46807 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, *Mycobacterium leprae*
- AAO29646 *Xylella fastidiosa* Temecula1
- NP_638204 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913
- NP_358970 *Streptococcus pneumoniae* R6
- NP_126586 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, *Pyrococcus abyssi*
- 25 NP_373671 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315
- NP_418374 [*Escherichia coli* K12
- NP_601979 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
- NP_343729 O-succinylhomoserine (thiol)-lyase, *Sulfolobus solfataricus*
- NP_786043 O-succinylhomoserine (thiol)-lyase, *Lactobacillus plantarum* WCFS1
- 30 NP_719586 *Shewanella oneidensis* MR-1
- CAD30944 *Streptomyces coelicolor* A3(2)
- NP_696324 *Bifidobacterium longum* NCC2705
- NP_457953 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi

NP_539021 *Brucella melitensis*

EAA30199 O-succinylhomoserine (Thiol)-lyase, *Neurospora crassa*

BAC61028 *Vibrio parahaemolyticus*.

- 5 De préférence, la cystathionine- γ -synthase modifiée telle que définie précédemment, comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

Par mutation, on entend selon l'invention la substitution d'un acide aminé de la séquence native par un acide aminé différent.

- 10 De préférence, la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

- 15 Ces acides aminés peuvent être identifiés par référence à la structure cristalline de la cystathionine- γ -synthases de *E. coli*, décrite par Clausen & al. (EMBOJ, Vol. 17, No. 23, pp 6827-6838, 1998).

De manière avantageuse, la mutation dans la partie C-terminale est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X2.

- 20 La cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention comprend avantageusement la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

dans laquelle

- 25 X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus, et
X2 représente G,A,L,I,V,F,M, de préférence A.

De manière avantageuse, la mutation dans la partie N-terminale est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R48 et/ou X13.

- 30 De manière préférentielle, la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée, selon l'invention comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

La cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention peut comprendre avantageusement la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

5

dans laquelle

X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,

X11 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire,

X13 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire,

X19 est défini ci-dessus ou représente un acide aminé apolaire, et

10

l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire tel que défini précédemment.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée est une cystathionine- γ -synthase telle que définie précédemment, modifiée pour permettre la conversion directe de la
15 O-succinyl-L-homosérine en L-méthionine avec le méthyl-mercaptan comme source de soufre (composé de formule générale (II) dans laquelle R représente le méthyle).

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8. Une séquence d'ADN codant pour cette
20 enzyme modifiée est représentée sur la SEQ ID NO 7.

La présente invention concerne également les cystathionine- γ -synthases modifiées telles que définies ci-dessus ainsi que les séquences d'acide nucléique codant pour ces cystathionine- γ -synthases modifiées, notamment les séquences
25 isolées, en particulier les séquences d'ADN et notamment la séquence représentée sur la SEQ ID NO 7, les vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant les dites séquences, en particulier les vecteurs comprenant lesdites séquences d'acide nucléique sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- γ -synthase modifiée dans un organisme hôte et les
30 organismes hôtes transformés avec lesdits vecteurs.

De manière avantageuse, les acylhomosérine sulfhydrylases « initiales » ou à activité « méthionine synthase » non modifiée sont choisies parmi les acylhomosérine sulfhydrylases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence COG2873.

- 5 Elles sont de préférence choisies parmi les acylhomosérine sulfhydrylases suivantes :

NP_785969 O-acetylhomoserine (thiol)-lyase, *Lactobacillus plantarum* WCFS1

AAN68137 O-acetylhomoserine sulfhydrylase, *Pseudomonas putida* KT2440

NP_599886 O-acetylhomoserine sulfhydrylase, *Corynebacterium glutamicum* ATCC

10 13032

NP_712243 acetylhomoserine sulfhydrylase, *Leptospira interrogans* serovar lai str. 56601

BAC46370 O-succinylhomoserine sulfhydrylase, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

- 15 AAO57279 O-succinylhomoserine sulfhydrylase, *Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000

NP_284520 O-succinylhomoserine sulfhydrolase [*Neisseria meningitidis* Z2491

AAA83435 O-succinylhomoserine sulfhydrylase (*P. aeruginosa*)

- 20 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la souche à activité « méthionine synthase » améliorée comprend une inactivation d'au moins un gène endogène impliqué dans la voie de biosynthèse habituelle de la méthionine.

- Ceci permet de sélectionner les souches qui ont développé le métabolisme alternatif selon l'invention pour la production de méthionine. Il est à noter que l'on obtient alors des souches auxotrophes pour la méthionine (e.g. *metE*), qui survivent en raison de leur possibilité à produire cet acide aminé par une voie alternative. Il peut être nécessaire, dans le test de criblage selon l'invention, que de la méthionine soit présente initialement dans le milieu de culture afin de permettre une première croissance des microorganismes.

- 30 Dans un mode de réalisation préféré, la souche bactérienne comprend une inactivation d'au moins un gène endogène choisi parmi *metB*, *metJ*, *metC*, *metE*, *metH*.

Une mutation du gène *metJ* a été proposée dans JP 2000157267-A/3, pour produire une quantité supérieure de méthionine (voir aussi GenBank E35587). Ce gène code pour une protéine de répression des gènes *met B*, *E*, *L*, *J* et *R* (chez *Salmonella typhimurium*). Son inactivation ou sa modification permet de diminuer le

5 rétrocontrôle par la méthionine.

Le gène *metC* (GenBank M12858), code la cystathionine-β-lyase (EC 4.4.1.8), les gènes *metE* (GenBank AE000458) et *metH* (GenBank J04975) codent la méthionine synthase (EC 2.1.1.13). La méthionine est un acide aminé essentiel à la vie cellulaire. L'inactivation d'un ou plusieurs de ces gènes revient à supprimer la

10 voie habituelle de biosynthèse de la méthionine.

En utilisant les références données sur GenBank pour ces gènes qui sont bien connus, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*. Ce travail de routine est avantageusement effectué en utilisant les séquences consensus pouvant être déterminées du fait de la

15 synthèse de ces gènes pour d'autres microorganismes, et en dessinant des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook et al. (1989 Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

20 La souche à activité « méthionine synthase » modifiée selon l'invention comprenant une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus comprend de préférence au moins une inactivation du gène *metE* et/ou *metH*, et/ou du gène *metC*, et/ou du gène *met B*.

Lorsque l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus permet d'effectuer la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide de formule générale (I), la souche selon l'invention comprend avantageusement au moins une inactivation du gène *metE* et/ou *metH* et/ou *metB*, de préférence au moins une inactivation du gène *metE*.

25

Lorsque l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée définie ci-dessus permet d'effectuer la conversion du substrat de formule générale (III) en homocystéine de formule générale (IV)

30



laquelle est ensuite transformée en acide de formule générale (I) par une enzyme appropriée, la souche selon l'invention comprend au moins une inactivation du gène *metC* et/ou *metB*. Elle peut également comprendre une inactivation du gène *metE* et/ou *metH* endogène. Dans ce cas, l'activité méthylase associée aux gènes *metE* et/ou *metH* est restaurée par l'introduction d'un gène codant pour une enzyme ayant la même activité. Cette enzyme peut avoir été sélectionnée et/ou modifiée pour permettre une amélioration des rendements de synthèse des acides aminés de formule générale (I).

10 Dans un mode de réalisation, ladite souche bactérienne peut comprendre également une modification de l'activité homosérine O-acyltransférase porté par le gène *metA* afin de lui conférer au choix une activité homosérine O-succinyltransférase (EC 2.3.1.46) ou homosérine O-acétyltransférase (EC 2.3.1.11).

15 Dans un mode particulier, on pourra remplacer ou modifier le gène *metA* de *E. coli*, codant l'enzyme possédant l'activité homosérine O-succinyltransférase (Genbank AAN83396), afin d'obtenir une activité homosérine O-acétyltransférase. Il est connu de l'homme du métier que cette activité est codée par le gène *metA* de *C. glutamicum* (Genbank AF052652). Les protocoles permettant de remplacer le gène *metA* de *E. coli* par le gène *metA* de *C. glutamicum*, ou de modifier la séquence de *metA* de *E. coli* afin d'obtenir une activité homosérine O-acétyltransférase au lieu d'une activité homosérine O-succinyltransférase sont connus de l'homme du métier.

20 De manière similaire on peut remplacer ou modifier le gène *metA* de *C. glutamicum*, codant une activité homosérine O-acétyltransférase, afin d'obtenir une activité homosérine O-succinyltransférase.

25

Toutes les modifications mentionnées ci-dessus peuvent être effectuées directement sur la souche objet de la pression de sélection, lorsque le procédé selon l'invention est mis en œuvre. Alternativement, il est préférable de mettre en œuvre le procédé de criblage selon l'invention sur une souche ne présentant qu'un nombre restreint de modifications, d'obtenir une souche présentant une activité « méthionine synthase » en présence du composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptopan, et d'effectuer alors d'autres modifications telles que mentionnées, afin d'augmenter le 'bypass' de la voie classique de synthèse de la méthionine.

30

L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique de microorganismes. La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou inductible. De façon alternative, on introduit, dans la cellule, un plasmide réplcatif (simple ou multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat.

L'inactivation d'un gène se fait préférentiellement par recombinaison homologe. Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les cellules ayant subi un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaison.

Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche bactérienne est une souche d'*E. coli*.

Dans un autre mode de réalisation, ladite souche bactérienne est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la souche bactérienne est la souche *E. coli* K183, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005. Cette souche comprend un gène exprimant une cystathionine- γ -synthase modifiée, l'enzyme comprenant la mutation E325A, décrite précédemment et une inactivation du gène *metE*.

Les souches de microorganismes selon l'invention possèdent une enzyme cystathionine- γ -synthase et/ou l'acylhomosérine sulphydrylase ; elles sont de préférence sélectionnées et améliorées par un procédé de criblage et d'évolution, qui est aussi un objet de l'invention. Les souches selon l'invention peuvent également être génétiquement modifiées (c'est-à-dire présenter une inactivation, une mutation

et/ou la suractivation d'au moins un gène endogène), la modification étant effectuée préalablement ou non à la mise en œuvre du procédé de criblage.

- 5 Afin d'accélérer la sélection et l'évolution dirigée des souches pour la production de méthionine en présence de composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptan, on peut effectuer les opérations ci-dessous. Le procédé est décrit pour le méthyl-mercaptan. Toutefois, l'homme du métier saura l'adapter avec tout autre composé de formule (II), en particulier l'H₂S.

- 10 a. Coupler la biosynthèse de la molécule d'intérêt à la croissance du microorganisme de telle sorte que la production de cette molécule est nécessaire pour une bonne croissance du microorganisme

Pour cette raison on peut faire le choix de détruire le gène *metE* codant la méthionine-synthase qui produit la méthionine à partir d'homocystéine. Ce faisant la souche devient auxotrophe pour la méthionine.

- 15 Le microorganisme, pour vivre en milieu minimum contenant une source de carbone simple et du méthylmercaptan ou méthylmercaptide de sodium, doit donc optimiser la voie de synthèse de la L-méthionine à partir de l'O-acyl-L-homosérine et du méthylmercaptan ou méthylmercaptide de sodium. Une modélisation informatique montre que dans ces conditions il est possible de doubler les rendements théoriques en méthionine (Tableau 1).

Rendements biomasse $Y_{X/S} (g \cdot g^{-1})$	Rendements méthionine ^a $Y_{P/S} (g \cdot g^{-1})$	Rendements méthionine ^b $Y_{P/S} (g \cdot g^{-1})$
0	0,36	0,74
0,11	0,30	0,62
0,28	0,21	0,42
0,44	0,12	0,24
0,61	0	0

- 20 Tableau 1 : rendements théoriques maximums pour la production de méthionine (g de produit/g de glucose) par *E. coli* dans le cas d'une fermentation sur glucose (a) et d'une fermentation sur glucose et méthyl-mercaptan (b) avec un rendement en biomasse constant (cultures continues).

- 25 Cependant, lorsque l'on souhaite produire un acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique différent de la L-méthionine, il est nécessaire de compléter le milieu en méthionine pour permettre la croissance du microorganisme.

b. Supprimer les régulations, notamment les rétro-inhibitions soit au niveau des enzymes, soit au niveau des gènes afin que la voie de biosynthèse principale soit potentialisée

On peut ainsi supprimer le gène *metJ* codant une protéine répresseur. Par ailleurs, il a été montré que l'homosérine trans-succinylase, codée par le gène *metA*, était rétro-inhibée par la méthionine et la S-adénosylméthionine (Taylor et al., 1966, J. Biol. Chem., 241 : 3641-3642). Il est donc souhaitable de remplacer cette enzyme par une enzyme insensible à la rétro-inhibition (Chater et al, 1970, J. Gen. Microbiol. 63: 121-131).

10

Un autre objet de l'invention est un test de criblage-identification permettant d'obtenir un microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, notamment la L-méthionine, en métabolisant un composé soufré de formule générale (II), en particulier un alkyl-mercaptan ou l'H₂S, notamment le méthyl-mercaptan.

Ainsi, la présente invention permet d'identifier des souches présentant des mutations dans leur génome, lesdites mutations permettant l'assimilation du composé de formule (II) par ladite souche, et la production dudit acide aminé de formule (I). Lesdites modifications induisent donc une modification/augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite souche. On peut alors accélérer la production de la souche produisant de la méthionine de façon autonome à partir d'une source de carbone simple et de composé de formule (II).

Un autre objet de l'invention est donc un procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale, éventuellement génétiquement modifiée, possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine-γ-synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I), en particulier de la L-méthionine, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré de formule (II), présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine-γ-synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, dans ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur

permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV).

5 Ladite souche bactérienne initiale présente éventuellement une inactivation et/ou une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif, d'au moins un gène endogène.

L'invention se rapporte également à une souche bactérienne présentant une modification dans le gène de l'enzyme cystathionine- γ -synthase et/ou dans le gène de
10 l'enzyme acylhomosérine sulphydrylase, induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite de ladite enzyme en présence du composé de formule (II), en particulier de méthyl-mercaptan. Une telle souche peut également présenter au moins une autre modification génétique, (inactivation, mutation ou surexpression d'un gène endogène), telle que mentionnée ci-dessus.

15 La souche selon l'invention est de préférence susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'invention, et en particulier est obtenue par le procédé selon l'invention.

L'invention se rapporte également à un procédé de préparation d'un acide 2-
20 amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) définie ci-dessus, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que défini précédemment, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) dans un milieu approprié, ledit milieu approprié comprenant une source de carbone simple telle que définie précédemment. De préférence, ledit acide aminé de formule (I) est la
25 méthionine, plus préférentiellement L-méthionine, et ledit composé soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptan ou l'H₂S.

Selon l'invention, les termes « culture » et « fermentation » sont employés indifféremment pour désigner la croissance de la bactérie sur un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple.

30 La définition des conditions de culture des microorganismes selon l'invention (fermentation) est à la portée de l'homme du métier. On fermente notamment les bactéries à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et

40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *C. glutamicum* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

La fermentation est généralement conduite en fermenteurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries
5 utilisées, contenant au moins une source de carbone simple ainsi que du composé soufré de formule (II).

En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in
10 Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96).

De manière analogue, le milieu minéral de culture pour *C. glutamicum* pourra
15 ainsi être de composition identique ou similaire au milieu BMCG (Liebl *et al.*, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) à un milieu tel que défini par Riedel *et al.* (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583).

Les milieux peuvent être supplémentés pour compenser les auxotrophies ; ils contiennent une concentration en carbone simple adaptée en fonction du mode de
20 culture et de production, ainsi que du composé soufré de formule (II) en concentration adaptée en fonction de l'évolution de la souche et du mode de production retenu.

Après fermentation, l'acide aminé de formule (I) est récupéré selon les méthodes usuelles, et le cas échéant, purifié.

25 Les techniques de récupération puis de purification des acides aminés de formule (I) dans les milieux de culture sont bien connues de l'homme du métier.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini précédemment, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)

30
$$R''-O-(CH_2)_2-CHNH_2-COOH \text{ (III)}$$

dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie précédemment, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini précédemment.

Le milieu réactionnel approprié est un milieu usuel de réaction enzymatique, bien connu de l'homme du métier, en particulier un milieu aqueux dans lequel les substrats et l'enzyme sont en solution ou en suspension. Les conditions de mise en œuvre de la réaction sont bien connues de l'homme du métier, afin notamment d'éviter une dénaturation substantielle de l'enzyme.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est une enzyme purifiée.

15

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : synthèse de la méthionine à partir de l'homosérine, chez les bactéries.

Figure 2 : Schéma de synthèse de la méthionine selon l'invention appliqué dans *E. coli* ; une stratégie équivalente est transposable chez de nombreux microorganismes dont *C. glutamicum*. Les stratégies *metB** ou *metY*** nécessitent l'utilisation d'une souche initialement au moins $\Delta(\text{metE})$ tandis que les stratégies *metB*** ou *metY** nécessitent l'utilisation d'une souche initialement au moins $\Delta(\text{metC})$.

20

Légende :

MetA : homosérine succinyltransferase ; pourra être remplacé par une isoforme insensible à la rétro-inhibition par la méthionine ou par une isoforme homoserine acetyltransferase éventuellement insensible à la rétro-inhibition par la méthionine.

25

MetB : cystathionine γ -synthase

MetB* : cystathionine γ -synthase évoluée en « méthionine synthase »

MetB** : cystathionine γ -synthase évoluée en homocysteine synthase

30

MetY* : O-acetyl-homosérine (de *C. glutamicum*) évoluée en homocysteine synthase

MetY** : O-acetyl-homosérine (de *C. glutamicum*) évoluée en « méthionine synthase »

La voie centrale représente la voie naturelle de synthèse de la méthionine chez *E. coli*. Les autres voies indiquées correspondent aux procédés selon l'invention.

- 5 **Figure 3** : représentation d'un mécanisme de fermentation continue pour la sélection dirigée des souches selon l'invention. Nous utilisons par exemple la technologie « Fedbatch-Pro » de la société DASGIP. Il s'agit d'un système modulaire contrôlé par ordinateur permettant la fermentation en parallèle de microorganismes en ayant un control de l'alimentation en milieu, en pH et pO₂.
- 10 **Figure 4** : Comparaison de spectres de ¹³C-RMN, correspondant au carbone 5 de la méthionine, obtenus par HSQC sur un hydrolysats de la souche sauvage (haut) ou de la souche K1a-F optimisée (bas). On observe que le carbone 5 de la souche K1a-F n'est pas marqué au carbone 13 ce qui confirme qu'il provient du méthylmercaptide de sodium
- 15 **Figure 5** : Alignement de séquences non modifiées de cystathionine-γ-synthases. Alignement réalisé avec l'algorithme MULTALIN
(<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>)
- Figure 6** : Alignement de séquences non modifiées de acylhomosérine sulfhydrylases. Alignement réalisé avec l'algorithme MULTALIN.
- 20 **Figure 7** : Cinétique de croissance de la population *E. coli* Δ(metC) lors de son ensemencement initial (culture N°1) et lors de son dixième repiquage (Repicage 10).

EXEMPLES

Exemple 1 : Construction de la souche Δ(metE)

- 25 L'inactivation du gène *metE* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645.

- 30 Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la stratégie:

- DnmetER de 100 bases (SEQ ID NO 9):

taaccccgacgcaagttctgcgccgctgcacatgttcgccagtcgcgcgggttctggccagccgcgcg
tttccagCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4012903 à 4012824) du gène *metE* (séquence 4010643 à 4012904, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

- 5 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645)

- DmetEF de 100 bases (SEQ ID NO 10):

10 tgacaatattgaatcacaccctcggtttccctcgcggttgccctgcgctcgcgagctgaaaaagcgcaagaaagt
attgGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4010644 à 4010723) du gène *metE*

- 15 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides DmetER et DmetEF sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans
20 laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides metER et metEF.

MetER (SEQ ID NO 11) : ggtttaagcagtatggtgggaagaagtcgc (homologue à la
25 séquence de 4012978 à 4012949)

MetEF (SEQ ID NO 12) : cccgggatgaataaactlgccgccttccc (homologue à la séquence de 4010567 à 4010596)

La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de
30 la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

Exemple 2 : Modification de la souche $\Delta(\text{metE})$ pour la production de méthionine à partir de méthyl-mercaptan

Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthyl-mercaptan, on effectue une sélection dirigée en flacons.

La souche *E. coli* K12 est préalablement rendue auxotrophe pour la méthionine en inactivant le gène *metE*, préparée selon les conditions de l'exemple 1 ne peut donc croître qu'en fabriquant sa propre méthionine, par l'utilisation du méthyl-mercaptan.

La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont la cystathionine- γ -synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » modifiée en présence de méthyl-mercaptan.

La sélection dirigée est conduite en flacon en verre hermétiquement fermé contenant 50 mL de milieu minéral (Schaefer et al., 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) en présence de 33 mM glucose, et du chloramphénicol à une concentration finale de 25 mg/l.

Les milieux de culture sontensemencés avec la souche *E. coli* K12 ΔmetE à $\text{DO}_{600\text{nm}}$ définie. On ensemence avec une population de bactéries suffisamment importante pour que certaines bactéries possèdent potentiellement des mutations spontanées intéressantes dans le gène *metB*, permettant d'assimiler le méthyl-mercaptan. Cette population a été obtenue par culture de la souche auxotrophe en méthionine sur milieu minimum supplémenté en méthionine.

Trois flacons reçoivent alors 100 μL d'une solution à 400 mg/L de sodium mercaptide, tandis qu'un quatrième flacon ne reçoit pas de sodium mercaptide. Les cultures sont réalisées sous agitation, à 37°C, pendant 6 jours, puis la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ est mesurée. Les résultats sont résumés dans le tableau N°3.

Tableau 3. Mesure de la densité optique de milieux de cultures pour *E. coli* en présence (flacons 1-3) ou absence (flacon témoin) de sodium mercaptide.

	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon Témoin
$\text{DO}_{600\text{nm}}$ à T=0	0.34	0.34	0.34	0.34
$\text{DO}_{600\text{nm}}$ à T=6 jours	0.23	1.14	0.79	0.32

Ces résultats montrent que les flacons 2 et 3 ont permis de multiplier une souche capable d'utiliser le méthyl-mercaptan pour produire la méthionine nécessaire à sa croissance (augmentation de la densité optique).

5 L'activité « méthionine synthase » améliorée observée provient d'une modification dans le gène de la cystathionine γ -synthase de la souche *E. coli* K12 $\Delta metE$, contenue dans les flacons 2 et 3.

La population bactérienne du Flacon 2 peut alors être utilisée pour améliorer davantage l'activité « méthionine synthase » en présence de méthyl-mercaptan, en utilisant un procédé de criblage et amélioration par fermentation en étage, ou en
10 recommençant le procédé en flacon tel qu'il vient d'être décrit.

Exemple 3 : Criblage et amélioration par fermentation en étage

Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthyl-mercaptan, on effectue une sélection.

15 La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont la cystathionine- γ -synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » améliorée en présence de méthyl-mercaptan.

Alternativement, on peut utiliser une souche obtenue selon l'exemple 2.

La sélection dirigée est conduite dans un système en continu en étage (Figure
20 3).

Le premier fermenteur produit les bactéries à une vitesse proche du taux de croissance maximum. Les bactéries passent en continu de ce fermenteur dans un second fermenteur caractérisé par un taux de dilution plus faible et un milieu avec le crible de sélection (ici, le méthyl-mercaptan).

25 La pression de sélection, imposée à la bactérie dans le second fermenteur, est établie par la concentration en méthyl-mercaptan. Des cycles successifs de sélection permettent d'appliquer aux bactéries des cribles de plus en plus fort par des concentrations croissantes en méthyl-mercaptan.

Pour chaque concentration, la souche sélectionnée dans le second fermenteur
30 est celle qui a évolué pour métaboliser la totalité du méthyl-mercaptan (méthyl-mercaptan résiduel nul dans le fermenteur).

Dans ce cas, on recommence la sélection en utilisant le fermenteur n°2 comme fermenteur de croissance et le fermenteur n°1 comme fermenteur de crible, présentant du méthyl-mercaptan de concentration plus forte qu'à l'étape précédente.

On effectue différents cycles de sélection pour obtenir une souche fermentant le méthyl-mercaptan avec une vitesse élevée. L'analyse de cette souche permet de définir les mutations dans le gène de la cystathionine- γ -synthase.

Exemple 4 :

La population d'*E. coli* K12 Δ metE issue du flacon 2 de l'exemple 2 a subi des repiquages successifs en flacon. La nouvelle population obtenue K1a-F est mise en culture dans un milieu minimum (Schaefer *et al.*, 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) contenant 2,5 g.l⁻¹ de glucose entièrement marqué au carbone 13 et du méthylmercaptide de sodium (200 ppm) non enrichi en carbone 13. Cette population est auxotrophe pour la méthionine en l'absence de méthylmercaptide de sodium.

Après la culture, les cellules sont récupérées, lavées puis hydrolysées par HCl 6N pendant 24 heures à 107°C. Une analyse par RMN bidimensionnelle est alors réalisée (HSQC). Cette analyse permet d'étudier le carbone 5 de la méthionine, qui provient, soit de la L-cystéine, produite à partir du glucose présent dans la solution (voie classique), soit du méthylmercaptide de sodium lorsque la nouvelle voie métabolique selon l'invention est utilisée.

L'expérience est conduite de manière similaire avec la souche sauvage *E. coli* K12 (produisant la méthionine à partir du glucose), en absence de méthylmercaptide de sodium.

La figure 4 montre deux spectres 1D, issus de deux acquisitions distinctes, superposés pour une meilleure lecture. Ces spectres 1D sont extraits de spectres RMN à deux dimensions type HSQC (corrélation entre protons et carbone 13). Les spectres RMN à deux dimensions ont été obtenus sur un hydrolysats acide des bactéries.

L'échantillon analysé est un hydrolysats total ; cependant du fait de la sensibilité de la RMN et des temps d'acquisition utilisés, on détecte essentiellement les acides aminés, les sucres, les bases et le glycérol. Chaque carbone (couplé à un proton) de chaque acide aminé donne une résonance magnétique nucléaire.

Le carbone 5 de la méthionine (c'est à dire le groupe méthyl terminal) présente un déplacement chimique d'environ 14,7 ppm. La figure 4 présente la zone de déplacement chimique centrée autour de 14,7 ppm pour les deux souches.

On remarque que dans le cas du spectre supérieur, le signal du carbone 5 est fort, indiquant que le carbone 5 est marqué au carbone 13. En conséquence, ce carbone 5 provient du glucose marqué introduit comme substrat dans le milieu de culture.

On remarque par contre que le même signal est très faible dans le spectre inférieur (souche K1a-F). Cela signifie que le carbone 5 n'est pratiquement pas marqué. Pourtant les autres carbones de la molécule sont fortement marqués (résultats non présentés). Le carbone 5 non marqué ne provient donc pas du glucose mais du méthyl-mercaptan.

On peut donc conclure que la souche K1a-F produit de la méthionine à partir de succinyl-L-homosérine et de méthylmercaptide de sodium.

Exemple 5 :

La population K1a-F subit 14 nouveaux cycles de repiquage successifs en flacon. On obtient ainsi la population K144 que l'on étale alors sur milieu minimum gélosé contenant du glucose pour seule source de carbone. Les boîtes inoculées sont placées en condition aérobie dans une jarre anaérobie dans laquelle est introduit un tube contenant du méthylmercaptide de sodium dissout dans de l'eau, la jarre est alors placée dans un incubateur à 37°C. La température d'ébullition du méthylmercaptide de sodium étant de 5°C, l'atmosphère de la jarre anaérobie s'enrichit en méthylmercaptan. Après 4 jours, les clones apparaissent sur les boîtes ; ils correspondent aux bactéries capables de produire de la méthionine en présence de méthylmercaptan. Dix clones sont isolés, dont le clone K176. Le clone K176 est multiplié en culture liquide et des stocks glycérols sont réalisés portant le numéro K183.

Le clone K183 est envoyé au séquençage en même temps que la souche E. coli K12 Δ(metE) initiale. Pour chaque clone la séquence des gènes *metJ* et *metB* (SEQ ID N°7) est déterminée. La séquence obtenue pour *metB* permet d'observer la présence d'une alanine en position 325 (SEQ ID N°8) en remplacement d'un

glutamate (SEQ ID N°6). Le gène *metJ* ne présente aucune mutation. Cette souche a été déposé à la CNCM le 2 avril 2003, sous le numéro I-3005.

Exemple 6 :

- 5 Le clone K183 est cultivé en flacon, en milieu minimum avec glucose et methylmercaptide de sodium pour seule source de carbone. En parallèle, une culture est réalisée dans des conditions identiques avec la souche *E. coli* K12 sauvage. On observe que la consommation de glucose par g de biomasse est deux fois plus importante que pour une souche de *E. coli* sauvage. La surconsommation est
10 probablement due en partie à la production d'acétate.

Souches	Rendement Biomasse	Rendement Acétate
MBM01	0.45	<0.002
K183	0.24	0.36

Comparaison du rendement de biomasse entre la souche *E. coli* sauvage et le clone évolué K183 :

Rendement Biomasse exprimé en $\text{g}(\text{biomasse})/\text{g}(\text{glucose})$.

- 15 Rendement Acétate exprimé en $\text{g}(\text{acetate})/\text{g}(\text{glucose})$.

L'analyse des métabolites intracellulaires et extracellulaire de ces deux cultures montre notamment :

- En intracellulaire, une augmentation de l'alanine, du pyruvate, du ketobutyrate et de 2 ketoisocaproate et une diminution de la concentration en
20 tryptophane, norvaline, norleucine, leucine et methionine.

En extracellulaire, une accumulation de glutamate, d'isoleucine, thréonine, valine et 2-ketoisocaproate et une diminution de pyruvate, norleucine, tryptophane.

- Exemple 7 :** Caractérisation de l'activité spécifique « méthionine synthase
25 » des souches MBM01 et K183 en présence de méthylmercaptan.

Afin de montrer l'amélioration de l'activité méthionine synthase dans la souche K183 par rapport à la souche sauvage (MBM01), des réactions enzymatiques sont réalisées en utilisant des extraits acellulaires préparés à partir de cultures des souches K183 et MBM01 réalisées sur riche (milieu BH1, commercialisé par DIFCO.

avec 2,5 g/L de glucose) en absence de méthylmercaptan. Les extraits protéiques sont désalés sur PD10 et réservés sur glace.

Conditions réactionnelles et traitement de l'échantillon

- Préparer sur la glace une solution de sodium methanethiolate diluée 10 fois (100 μ l de solution 3M plus 900 μ l d'eau mQ)
- Préparer sur la glace les mélanges réactionnels constitué de 20 μ L de tampon phosphate 500 mM pH 6.5, 10 μ l Pyridoxal phosphate 2,5 mM, 16 μ L O-succinylhomosérine 25 mM, 10 μ L Sodium methanethiolate 0,3 M, 24 μ L eau milliQ.
- placer les tubes à 37°C (thermomixer sous la hotte) et ajouter l'extrait protéique (20 μ l) pour démarrer la réaction.
- Pour arrêter la réaction (0 à 30 minutes), placer les tubes sur glace et ajouter 400 μ l d'acétone à -20°C.
- placer les tubes à -20°C pendant 30 minutes
- puis ouvrir les tubes sous la hotte pendant 10 minutes pour évaporer le méthane-thiol et l'acétone (les maintenir sur glace)
- centrifuger 5 minutes à 10000 g (petite centri), transvaser le surnageant (~100 μ L) dans des tubes éppendorf et diluer pour un volume final de 1 mL.

Mesure de l'activité méthionine synthase en détectant la quantité de succinate libéré du succinylhomosérine :

- Dix μ l de l'échantillon ci-dessus obtenu sont analysés par chromatographie ionique en utilisant un Appareil Dionex DX-500 équipé d'une précolonne AG-11 2 mm et d'une colonne AS-11 2 mm, d'un suppresseur ASRS Ultra, d'une boucle injection 10 μ l. Un gradient est alors appliqué : 0 – 7 min 0,5 mM KOH ; 7 min injection ; 7 – 9,5 min 0,5 mM KOH ; 9,5 – 13 min 0,5 – 5 mM KOH ; 13 – 25 min 5 – 38,3 mM KOH.

Mesure de l'activité méthionine synthase en détectant la quantité de méthionine synthétisée en présence de méthylmercaptan

- L'analyse est réalisée par GC-MS ce qui nécessite de silyler les échantillons préalablement à l'injection. Pour cela chaque échantillon reçoit un standard interne (serine-13C) qui permet de valider la qualité de la silylation. Les échantillons sont ensuite lyophilisés pendant la nuit.

La dérivation est réalisée en appliquant le protocole suivant :

Ajouter 400 µl de la solution d'hydroxylamine (0,250g +/- 0,002 g dissous dans 10 ml de Pyridine) à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml et fermer correctement les tubes. Mélanger à l'aide d'un Vortex pendant 2 fois 10 secondes. Concentrer le milieu réactionnel au fond du tube par centrifugation (maxi 1 minute à 5000 g) et laisser réagir 1 heure 30 à 30°C. Ouvrir les tubes et ajouter 1000 µl de solution de BSTFA à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml et compléter avec 100µl de Pyridine (pipette automatique de 200 µl). Refermer les tubes, vortexer pendant 10 secondes et mettre à incuber respectivement pendant 60 minutes à 60°C dans le cas des dérivés TBDMS et 30 minutes à 70°C pour le BSTFA. Si nécessaire filtrer les échantillons sur filtre à usage unique avec membrane PTFE de 0,22 µm ou centrifuger à 5000 g pendant 5 minutes. Transférer dans un flacon de 1,5 ml, sertir et injecter en CPG.

Les analyses ont été réalisées avec l'appareil Agilent technologies GC6890/MSD5973 équipé d'une colonne apolaire (HP-5MS, Bios Analytique). Le gaz vecteur est l'hélium à débit constant de 1 ml.min⁻¹. L'injection de 1 µl d'échantillon a lieu en mode splitless avec un débit de purge de 50 ml.min⁻¹ pendant 0,85 min. Le profil de température est le suivant : la température initiale de 90°C est maintenue pendant 2 minutes puis augmente jusqu'à 320 °C avec une pente de 10 °C.min⁻¹. Cette température est maintenue pendant 6 minutes. La détection se fait par spectrométrie de masse avec ionisation par impact électronique en mode balayage dans une gamme variant de m/z = 40 à 550 amu. Le délai de passage de solvant est réglé à 3,10 minutes.

Résultats

Dans ces conditions, une activité « méthionine synthase » a pu être dosée dans les échantillons incubés avec le méthanethiol, via la quantification d'une part, du succinate par chromatographie ionique et d'autre part, de la méthionine par GC-MS.

Souche	Culture	Extrait protéique	Concentration en protéines	Activité spécifique (mUI/mg protéines)	
				Dosage Succinate	Dosage Méthionine
MBM01	FB 137/P2	Z63	3,43	0,30	0,23
K183	FB 140/P2	Z64	3,62	1,40	1,72

On observe donc que l'activité méthionine synthase en présence de methylmercaptan est renforcée dans la souche évoluée par rapport à la souche sauvage confirmant que la cystathionine γ -synthase mutée (E325A) a une activité méthionine synthase modifiée.

Exemple 8 : Construction de la souche $\Delta(metC, metJB)$ puis sélection d'un gène *metY* évolué.

10 **Construction des souches MG1655 ($\Delta metC::Cm$) et MG1655 ($\Delta metC$)**

Pour inactiver le gène *metC* la stratégie de recombinaison homologue décrite par Datsenko & Wanner (2000) est utilisée. Cette stratégie permet l'insertion d'une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie du gène concerné. Pour cela, nous avons utilisé deux oligonucléotides :

15 Pour *metC* :

- DmetCR de 100 bases (SEQ ID NO 13):

ccggcggtccagatcggcaatcagatcgtcgacatcttccagaccaatatgcaggcgaatcaaggtcccgctaa
aatcgatCATATGAATATCCTCCTTAG

avec

20 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3151419 à 3151359) du gène *metC* (séquence 3150251 à 3151438, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol (séquence de référence dans la publication Datsenko, K.A. et Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97 : 6640-6645)

25 - DmetCF de 100 bases (SEQ ID NO 14) :

cggacaaaaagcttgataactcaactggtgaatgcaggacgcagcaaaaaatacactctcggcgcggttaaatag
cgtgattTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3150255 à 3150334) du gène *metC*

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol.

- 5 Les oligonucléotides DmetCR et DmetCF sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est ensuite introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinaise exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et
- 10 l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides metCR et metCF. La souche retenue est nommée MG1655 ($\Delta metC::Cm$).

MetCR (SEQ ID NO 15) : cgtccgggacgccttgatcccggacgcaac (homologue à la séquence de 3151522 à 3151493)

- 15 MetCF (SEQ ID NO 16) : gcgtttacgcagtaaaaaagtcaccagcacgc (homologue à la séquence de 3150118 à 3150149)

- La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches
- 20 recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche retenue est nommée MG1655 ($\Delta metC$).

Construction de la souche MG1655 ($\Delta metB$ - $\Delta metJ$)

- 25 Pour déléter les gènes *metB* et *metJ*, nous avons inséré une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en délétant la majeure partie des gènes concernés. Pour cela, nous avons utilisé deux oligonucléotides.

Pour *metBJ* :

- MetJR de 30 bases (SEQ ID NO 18):
- 30 ggtacagaaaccagcaggctgaggatcagc
homologue à la séquence (4125431 à 4125460) en aval du gène *metJ*
(séquence 4125975 à 4125581, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

- DmetJBF de 100 bases (SEQ ID NO 17) :

tatgcagctgacgaccttgcgccctgctgcgcaatcacactcattttacccttgttgcagcccgaagccat
tttcaggcaccagagtaaacatt

avec

5 une partie homologue (caractères majuscule) à la séquence (4126217 à 4126197) entre les gènes *metJ* et *metB* (séquence 4126252 à 4127412) contenant la région promotrice de l'opéron *metBLF*.

une partie homologue (caractères minuscule) à la séquence (4127460 à 4127380) correspondant au début du gène *metL* (séquence 4127415 à 4129847) et à
10 la fin du gène *metB*.

Ces deux oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier la région concernée sur l'ADN chromosomique de MG1655 ($\Delta metJ :: Cm$) (figure 8).

Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinaise exprimée permet la
15 recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et la délétion de gène *metB* par recombinaison homologue est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides MetJR et MetLR.

MetJR (SEQ ID NO 18) : ggtacagaaaccagcaggctgaggatcagc (homologue à la séquence 4125431 à 4125460)

20 MetLR (SEQ ID NO 19) : aaataacacttcacatcagccagactactgccaccaaattt (homologue à la séquence de 4127500 à 4127460)

L'évènement de recombinaison homologue peut avoir lieu à deux endroits (figure 9).

Seul le cas B de la figure 9 (ligne inférieure) correspond à la souche souhaitée
25 MG1655 ($\Delta metB - \Delta metJ :: Cm$) où les gènes *metJ* et *metB* ont été éliminés et le promoteur de l'opéron *metBLF* remplacé devant *metL*.

La cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches
30 recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment (MetLR et MetJR).

Construction des souches MG1655 $\Delta(\text{metC}::\text{Cm}, \text{metJB})$ et MG1655 $\Delta(\text{metC}, \text{metJB})$

Pour déléter le gène *metC* (séquence 3150251 à 3151438, séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>) de la souche MG1655 ($\Delta\text{metB-}$
 5 ΔmetJ), nous avons utilisé la technique de transduction avec le phage P1. Le protocole suivi est réalisé en deux étapes avec la préparation du lysat de phage sur la souche MG1655 ($\Delta\text{metC}::\text{Cm}$) puis transduction dans la souche MG1655 ($\Delta\text{metB-}$
 ΔmetJ).

Préparation du lysat de phage P1 :

- 10 - Ensemencement par 100µl d'une culture de nuit de la souche MG1655 ($\Delta\text{metC}::\text{Cm}$) de 10 ml de LB + Cm 30µg/ml + glucose 0,2% + CaCl₂ 5 mM
- Incubation 30 min à 37°C sous agitation
- Ajout de 100 µl de lysat de phage P1 préparé sur la souche sauvage MG1655 (environ 1.10⁹ phage/ml)
- 15 - Agitation à 37°C pendant 3 heures jusqu'à la lyse totale des cellules
- Ajout de 200 µl de chloroforme et vortex
- Centrifugation 10 min à 4500g pour éliminer les débris cellulaires
- Transfert du surnageant dans un tube stérile et ajout de 200 µl de chloroforme
- Conservation du lysat à 4°C

20 **Transduction**

- Centrifugation 10 min à 1500g de 5 ml d'une culture de nuit de la souche MG1655 ($\Delta\text{metB-}\Delta\text{metJ}$) en milieu LB
- Suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM
- Tubes témoins : 100 µl cellules
- 25 100 µl phages P1 de la souche MG1655 ($\Delta\text{metC}::\text{Cm}$)
- Tube test : 100 µl de cellules + 100 µl de phages P1 de la souche MG1655 ($\Delta\text{metC}::\text{Cm}$)
- Incubation 30 min à 30°C sans agitation
- Ajout de 100 µl de citrate de sodium 1 M dans chaque tube puis vortex
- 30 - Ajout de 1 ml de LB
- Incubation 1 heure à 37°C sous agitation
- Etalement sur des boîtes LB + Cm 30 µg/ml après centrifugation 3 min à 7000 rpm des tubes.

- Incubation à 37°C jusqu'au lendemain

Vérification de la souche

Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la région contenant (*metC*::Cm) est vérifiée par une analyse PCR avec
 5 les oligonucléotides MetCR et MetCF d'une part et MetJR et MetLR d'autre part afin de vérifier également la souche délétée des gènes *metB* et *metJ*. La souche retenue est dénommée MG1655 Δ (*metC*::Cm, *metJB*).

MetCR (SEQ ID NO 21) : cgtccgggacgccttgatcccggacgcaac (homologue à la séquence de 3151522 à 3151493)

10 MetCF (SEQ ID NO 22) : gcgtttacgcagtaaaaaagtcaccagcacgc (homologue à la séquence de 3150118 à 3150149)

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol peut ensuite être éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors
 15 introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment (MetCR et MetCF d'une part et MetJR et Met LR d'autre part). La souche retenue est dénommée MG1655 Δ (*metC*, *metJB*).

20 **Construction du plasmide pTopo-*metY***

Parallèlement un plasmide permettant l'expression du gène *metY* de *C. glutamicum* sera construit. Par exemple, ce gène peut être amplifié par PCR à partir d'ADN chromosomique de *C. glutamicum* puis introduit dans un plasmide. On pourra choisir d'amplifier par PCR le gène *metY* et éventuellement son promoteur naturel.
 25 Dans un mode de réalisation préféré, on clonera le gène *metY* sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression dans *E. coli*. Les vecteurs utilisés pourront être choisis parmi les vecteurs pUC, pBluescript, pTopo, pCR-Script, ... Dans un mode de réalisation particulier, on pourrait utiliser le plasmide pSL191, décrit par Hwang *et al.* (2002) *J. Bact.* 184(5) : 1277-1286, qui comprend le gène *metY* sous le contrôle de
 30 son promoteur naturel cloné dans un vecteur navette *C. glutamicum* – *E. coli* pMT1.

La souche *Escherichia coli* Δ (*metC*, *metJB*) précédemment obtenue est transformée avec un plasmide portant le gène *metY* de *C. glutamicum*. La

transformation de la souche pouvant être réalisée selon l'une des techniques connues de l'homme du métier.

La souche obtenue sera ensuite inoculée dans un Erlen Meyer contenant 10% de son volume en milieu minimum avec glucose pour seule source de carbone. La faible activité succinylhomoserine sulfhydrylase initialement portée par l'enzyme MetY devrait limiter la croissance de la population bactérienne du fait d'une limitation en méthionine synthétisée. Des repiquages sont réalisés tous les 4 jours pendant 1 mois. L'amélioration de l'activité succinylhomoserine sulfhydrylase portée par la protéine MetY devrait se traduire par une synthèse accrue en méthionine ; on devrait donc observer une amélioration du taux de croissance de la population bactérienne entre chaque repiquage, ce qui imposera le cas échéant d'augmenter la fréquence de repiquage afin de maintenir les microorganismes dans une phase de division. On évitera en effet de maintenir trop longtemps les cultures dans une phase stationnaire. Lorsque le taux de croissance se stabilisera d'un repiquage à un autre, on considérera que la souche a suffisamment évolué et la sélection de trois clones sera réalisée. Leur séquençage permettra de déterminer la séquence évoluée *metY**. Dans cette première étape, l'évolution du gène *metY* aura permis de modifier l'activité O-acetyl-homosérine sulfhydrylase en une activité O-succinyl-homosérine sulfhydrylase permettant de produire de l'homocystéine à partir d'O-succinylhomosérine et d'H₂S ; ces deux substrats étant produits par la bactérie.

Afin d'optimiser le processus d'évolution de *metY*, une démarche similaire peut-être réalisée en utilisant d'autres mutants d'*Escherichia coli*, on pourra notamment utiliser le mutant $\Delta(\textit{metC}, \textit{metB})$.

25 **Exemple 9 : Procédé de culture Fed-Batch pour la production et la purification de méthionine.**

Préculture :

La préculture est réalisée pendant une nuit en fiole de 500 ml contenant 50 ml de milieu minimum type M9 modifié, complété avec 2.5 g/l de glucose. Les cellules sont récupérées par centrifugation et reprises dans 5 ml de milieu minimum type M9 modifié.

Culture en fermenteur.

La culture est réalisée dans un fermenteur de volume utile de 300ml de type Fedbatch-pro DASGIP.

Le fermenteur est rempli avec 145 ml de milieu minimum type M9 modifié et inoculer avec les 5 ml de préculture. Soit une DO600nm d'inoculation comprise entre 0.5 et 1.2.

La température de la culture est maintenue entre 30 et 37°C et le pH est ajusté en permanence à une valeur comprise entre 6.5 et 8. Il est partiellement régulé par l'ajout d'une solution CH₃SNa. Une solution de soude 2N peut le cas échéant compléter la régulation. L'agitation est maintenue à entre 200 et 400 rpm pendant la phase de batch et est augmentée jusqu'à 1000 rpm en fin de fed-batch. La teneur en O₂ dissout est maintenue entre 30% et 40% de saturation en utilisant un contrôleur de gaz. Dès que la OD 600nm à une valeur comprise entre 2.5 et 3 nous commençons le fed-batch par ajout du milieu de fed à un débit initial compris entre 0.3 et 0.5 ml/h avec une augmentation progressive jusqu'à des débits compris entre 2.5 et 3.5 ml/h. après ce stade le débit est maintenu constant pendant un temps compris entre 24h et 32h. Le milieu de fed est constitué sur la base d'un milieu M9 modifié complétement par une concentration en glucose comprise entre 300 et 500g/l de glucose. Dans le même temps nous complétons le milieu avec une solution de CH₃SNa (solution entre 1 et 5M) afin de permettre la croissance de la bactérie tout en régulant le pH. Dès que la concentration cellulaire atteint une concentration comprise entre 20 et 50 g/l nous remplaçons le milieu de fed par un milieu minimum type M9 limité en phosphore. La solution de méthyl-mercaptan est remplacée par une injection directe de CH₃SH sous forme gazeux dans le fermenteur. Le débit du gaz est adapté au débit de la solution de fed dans des rapports molaires avec le substrat carboné de 1 à 3. Dès que la concentration cellulaire est comprise entre 50 et 80 g/l la fermentation est arrêtée. Le mout de fermentation est ajusté à un pH compris entre 7.5 et 9 par une solution de NaOH puis chauffé à entre 60 et 80°C. Le mout est ensuite filtré sur des modules UF. La température du jus est maintenue entre 60 et 80°C, puis le jus est concentré avant passage sur charbon pour décoloration (en colonne ou en batch). Le jus décoloré est de nouveau filtré pour retirer les dernières particules avant d'être acidifié par HCl concentré jusqu'à un pH inférieur à 2.28 (pK₁ de la méthionine). Les cristaux methionine.HCl ainsi formés sont récupérés par filtration, puis l'HCl est éliminé par évaporation pour purifier la L-Méthionine.

Exemple 10: Production de méthionine avec une souche $\Delta(metC)$

- La construction de la souche $\Delta(metC)$ est décrite dans l'exemple 7. Dans un mode particulier de l'invention la souche *E. coli* $\Delta(metC)$ est mise en culture en flacon (voir exemple 2) contenant un milieu minimum avec glucose comme seule source de carbone. Le milieu ne contient ni méthylmercaptop, ni H_2S . Des repiquages sont réalisés et les taux de croissances sont déterminés pour chaque repiquage. On observe une très nette amélioration du taux de croissance de la souche $\Delta(metC)$ sur milieu minimum (Voir Figure n° 7) suggérant que l'activité homocysteine synthase portée par la cystathionine γ -synthase s'est fortement améliorée en présence d' H_2S endogène.

Cycles de repiquage N°	μ mesuré (h^{-1})
1	0,05
3	0,37
5	0,39
10	0,44
12	0,44

Dépôt de matériel biologique

- La souche K183 a été déposée le 02 Avril 2003 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest, sous le Numéro d'ordre I-3005.

Revendications

1. Souche de microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I)



5 dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou des groupe(s) hydroxy, ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrrolyle, pyrazolyle, triazolyle, tetrazolyle, thiazolyle, ou thienyle,

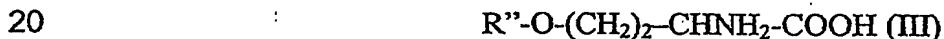
10 par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :



dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,

15 ladite souche comprenant au moins un gène codant pour une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée.

2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée effectue la conversion directe d'un substrat dérivé de formule générale (III)

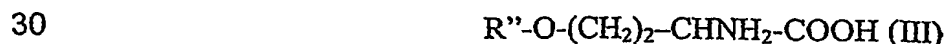


dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

en acide aminé de formule générale (I).

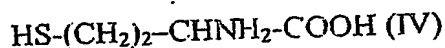
3. Souche selon la revendication 2, caractérisée en ce que la source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente le radical R.

4. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée effectue la conversion d'un substrat dérivé de formule générale (III)



dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

en homocystéine de formule générale (IV)



laquelle est ensuite transformée en acide aminé de formule générale (I) par une enzyme appropriée.

5 5. Souche selon la revendication 4, caractérisée en ce que la source de soufre est un composé de formule générale (II) pour laquelle R' représente un atome d'hydrogène.

6. Souche selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que R représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone.

10 7. Souche selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique de formule générale (I) obtenu est la L-méthionine.

8. Souche selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le microorganisme est choisi parmi les bactéries.

15 9. Souche selon la revendication 8, caractérisée en ce que la bactérie est choisie parmi *E. coli* et les corynébactéries.

10 10. Souche selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est choisie parmi les cystathionine-γ-synthases et les acylhomosérine sulfhydrylases à activité
20 « méthionine synthase » modifiée.

11. Souche selon la revendication 10, caractérisée en ce que la modification de l'enzyme consiste en une mutation de manière à ce que la transformation du substrat de formule générale (III) se fasse de manière préférentielle avec le composé de formule générale (II) plutôt qu'avec la L-cystéine.

25 12. Souche selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisée en ce que la cystathionine-γ-synthases à activité « méthionine synthase » non modifiée est sélectionnées parmi les cystathionine-γ-synthases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence CPG0626.

30 13. Souche selon la revendication 12, caractérisée en ce que la cystathionine-γ-synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée est la cystathionine-γ-synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO : 6, et les séquences homologues de cette séquence.

14. Souche selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

5 X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

Dans laquelle

X1 représente A,G,S, de preference A

X2 représente E,V,P,T, de preference E

X3 représente S,T,N, de preference S

10 X4 représente G,D,A,H,T, de preference G

X5 représente V,A,T,H,N, de preference V

X6 représente E,R,K,F, de preference E

X7 représente S,T, de preference S

X8 représente L,I,V,A, de preference L et

15 X9 représente I,V,A,T, de preference I.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- γ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

15. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale (zone conservée 2) :

X10-X11-Y-X12-R-X13-X14-X15-X16-X17-X18

Dans laquelle

X10 représente H,Y,F,L,K, de preference A

25 X11 représente E,D,K,R,V,I, de preference Y

X12 représente S,A,T,P,G, de preference S

X13 représente I,S,T,R,E,F,W,D, de preference S

X14 représente S,G,A,I,E,N,K,P, de preference G

X15 représente N,H,Q,S, de preference N

30 X16 représente P,D,L, de preference P

X17 représente T,M,N,G,S, de preference T et

X18 représente R,L,V,S,W,E, de preference R.

14. Souche selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie C-terminale (zone conservée 1)

5 X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

Dans laquelle

X1 représente A,G,S, de preference A

X2 représente E,V,P,T, de preference E

X3 représente S,T,N, de preference S

10 X4 représente G,D,A,H,T, de preference G

X5 représente V,A,T,H,N, de preference V

X6 représente E,R,K,F, de preference E

X7 représente S,T, de preference S

X8 représente L,I,V,A, de preference L et

15 X9 représente I,V,A,T, de preference I.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- γ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

15. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » non modifiée, comprend la séquence d'acide aminés suivante dans sa partie N-terminale (zone conservée 2) :

X10-X11-Y-X12-R-X13-X14-X15-X16-X17-X18

Dans laquelle

X10 représente A, H,Y,F,L,K, de preference A

25 X11 représente Y, E,D,K,R,V,I, de preference Y

X12 représente S,A,T,P,G, de preference S

X13 représente I,S,T,R,E,F,W,D, de preference S

X14 représente S,G,A,I,E,N,K,P, de preference G

X15 représente N,H,Q,S, de preference N

30 X16 représente P,D,L, de preference P

X17 représente T,M,N,G,S, de preference T et

X18 représente R,L,V,S,W,E, de preference R.

correspondant aux résidus 44 à 54 de la séquence de cystathionine- γ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

16. Souche selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase modifiée comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

17. Souche selon la revendication 16, caractérisée en ce que la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

18. Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que la mutation dans la partie C-terminale de la cystathionine- γ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie dans la revendication 14, en particulier au niveau du résidu X2.

19. Souche selon la revendication 18, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

dans laquelle

X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus, et

X2 représente G, A, L, I, V, F, M, de préférence A.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- γ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 8.

20. Souche selon la revendication 19, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

correspondant aux résidus 324 à 332 de la séquence de cystathionine- γ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

21. Souche selon la revendication 20, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8.

correspondant aux résidus 44 à 54 de la séquence de cystathionine- γ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

16. Souche selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase modifiée comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale, et/ou au moins une mutation dans sa partie N-terminale.

17. Souche selon la revendication 16, caractérisée en ce que la mutation consiste à remplacer un acide aminé acide, lequel interagit avec le co-substrat cystéine pour l'enzyme non modifiée, par un acide aminé apolaire, sélectionné parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

18. Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que la mutation dans la partie C-terminale de la cystathionine- γ -synthase est introduite parmi les acides aminés acides de la « zone conservée 1 » telle que définie dans la revendication 14, en particulier au niveau du résidu X2.

19. Souche selon la revendication 18, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

X1-X2-X3-L-G-X4-X5-X6-X7-X8-X9

dans laquelle

X1, X3, X4, X5, X6, X7, X8 et X9 sont définis ci-dessus, et

X2 représente G, A, L, I, V, F, M, de préférence A.

correspondant aux résidus 324 à 334 de la séquence de cystathionine- γ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 8.

20. Souche selon la revendication 19, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie C-terminale :

A-A-S-L-G-G-V-E-S

correspondant aux résidus 324 à 332 de la séquence de cystathionine- γ -synthase de *E. coli* K12, représentée sur la SEQ ID NO 6.

21. Souche selon la revendication 20, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés représentée sur la SEQ ID NO 8.

22. Souche selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- γ -synthase est introduite parmi les acides aminés de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R48 et/ou X13.

- 5 23. Souche selon la revendication 22, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

- 10 X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,
X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,
X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,
X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et
l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire,
15 les acides aminés apolaires étant parmi choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « méthionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

- 20 25. Cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

- 25 27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

- 30 28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- γ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

22. Souche selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- γ -synthase est introduite parmi les acides aminés de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R et/ou X13.

- 5 23. Souche selon la revendication 22, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

- 10 X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,
X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,
X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,
X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et
l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire.
15 les acides aminés apolaires étant parmi choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « méthionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

25. Cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée
20 telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation
25 nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- γ -synthase ou acylhomosérine
30 sulphydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1, 6 ou 7. et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

22. Souche selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisée en ce que la mutation dans la partie N-terminale de la cystathionine- γ -synthase est introduite parmi les acides aminés de la « zone conservée 2 » telle que définie ci-dessus, en particulier au niveau du résidu X11 et/ou R et/ou X13.

- 5 23. Souche selon la revendication 22, caractérisée en ce que la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée comprend la séquence d'acides aminés suivante dans sa partie N-terminale :

X10-X11-Y-X12-X19-X13-X14-X15-X16-X17-X18

dans laquelle

- 10 X7, X9, X12, X14, X15, X16, X17 et X18 sont définis ci-dessus,
X11 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,
X13 est défini dans la revendication 15 ou représente un acide aminé apolaire,
X19 est R ou représente un acide aminé apolaire, et
l'un au moins de X11, X13 et X19 représente un acide aminé apolaire,
15 les acides aminés apolaires étant parmi choisis indépendamment parmi les résidus glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine ou méthionine.

24. Souche *E. coli* K183 à activité « méthionine synthase » modifiée, déposée à la CNCM le 2 avril 2003 sous le numéro I-3005.

25. Cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée
20 telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

26. Séquence d'acides nucléiques codant pour une cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée selon la revendication 25.

27. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique selon la revendication 26, sous le contrôle d'éléments de régulation
25 nécessaires à l'expression et la transcription de la cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase » modifiée dans un organisme hôte.

28. Procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale possédant un gène codant pour une enzyme cystathionine- γ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée
30 produisant un acide aminé de formule (I) défini selon l'une des revendications 1, 6 ou 7, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme, induisant une modification de l'activité « méthionine synthase » en présence d'un composé soufré

de formule (II) défini selon l'une des revendications 1 à 7, présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- γ -synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, dans
 5 ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) défini selon l'une des revendications 1 à 7, en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) défini selon l'une des revendications 1 à 7.

10 29. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée défini selon l'une des revendications 1 à 24 ou obtenu par le procédé de sélection selon la revendication 28, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) défini selon l'une des
 15 revendications 1 à 7, dans un milieu approprié comprenant une source de carbone simple.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'acide aminé de formule (I) est la méthionine, plus préférentiellement L-méthionine.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le composé
 20 soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptan ou l'H₂S.

32. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)



25 dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,

avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 1 à 23, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini dans l'une des
 30 revendications 1 à 7.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

- de formule (II) défini selon l'une des revendications 1, 3, 5, 6 ou 7, présentant l'étape consistant à soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence du composé de formule (II), afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine-γ-synthase ou acylhomosérine sulfhydrylase, dans
- 5 ladite souche bactérienne, ladite évolution consistant en une mutation pour leur permettre de réaliser de manière préférentielle la conversion directe du substrat de formule générale (III) défini selon la revendications 2, en acide aminé de formule générale (I) ou en homocystéine de formule générale (IV) défini selon la revendications 4.
- 10 29. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « méthionine synthase » modifiée défini selon l'une des revendications 1 à 24 ou obtenu par le procédé de sélection selon la revendication 28, en présence d'un composé soufré de formule générale (II) défini selon l'une des
- 15 revendications 1 à 7, dans un milieu approprié comprenant une source de carbone simple.
30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'acide aminé de formule (I) est la méthionine, plus préférentiellement L-méthionine.
31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le composé
- 20 soufré de formule (II) est le méthyl-mercaptan ou l'H₂S.
32. Procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique de formule (I) défini selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel on fait réagir substrat dérivé de formule générale (III)
- $$\text{R}''\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH (III)}$$
- 25 dans laquelle R'' représente un radical acyle, de préférence choisi parmi le radical succinyle ou le radical acétyle,
- avec une enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée telle que définie dans l'une des revendications 1 à 23, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini dans l'une des
- 30 revendications 1 à 7.
33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

34. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « méthionine synthase » modifiée est une enzyme purifiée.

35. Procédé selon l'une des revendications 32 à 34, caractérisé en ce que l'enzyme est une cystathionine- γ -synthase à activité « méthionine synthase »
5 modifiée telle que définie dans l'une des revendications 10 à 23.

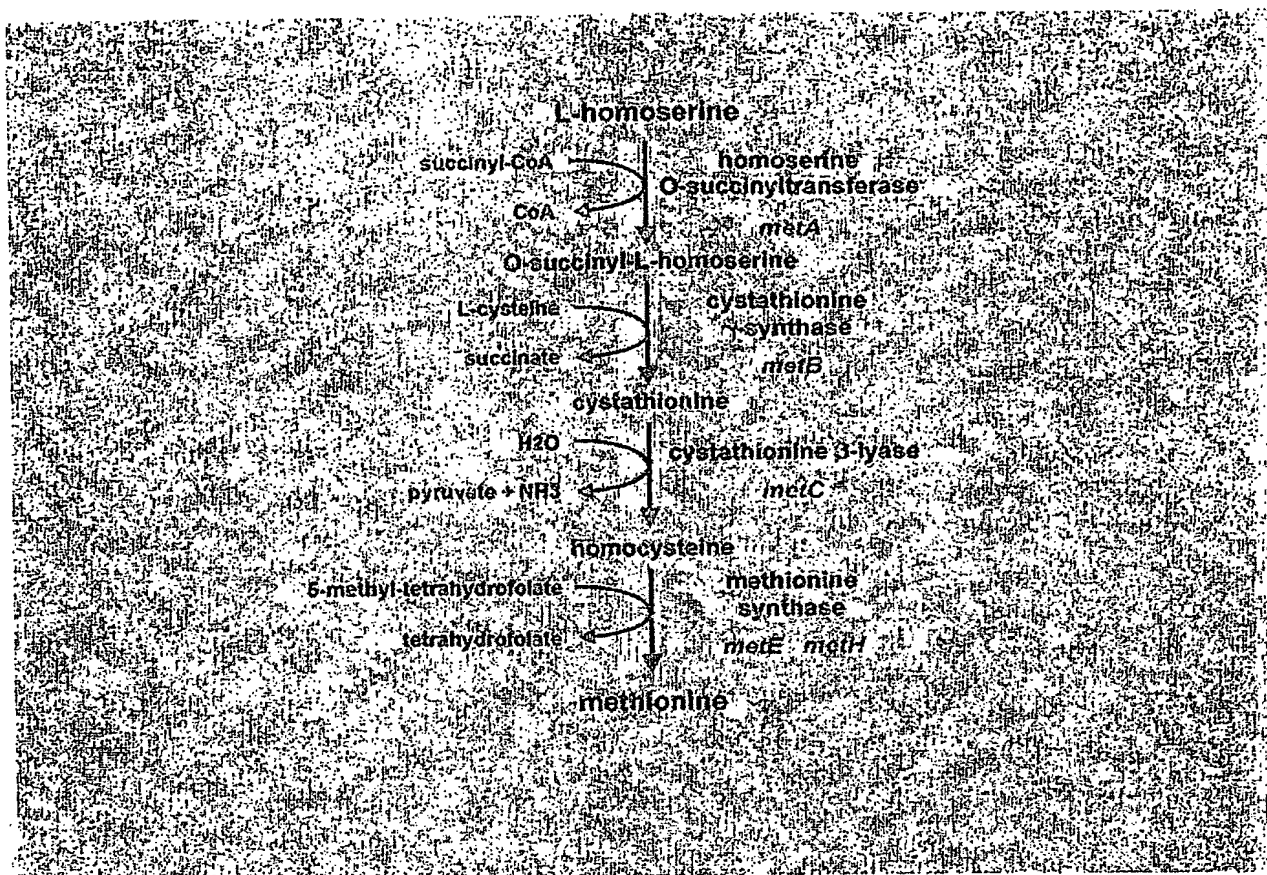


Figure 1

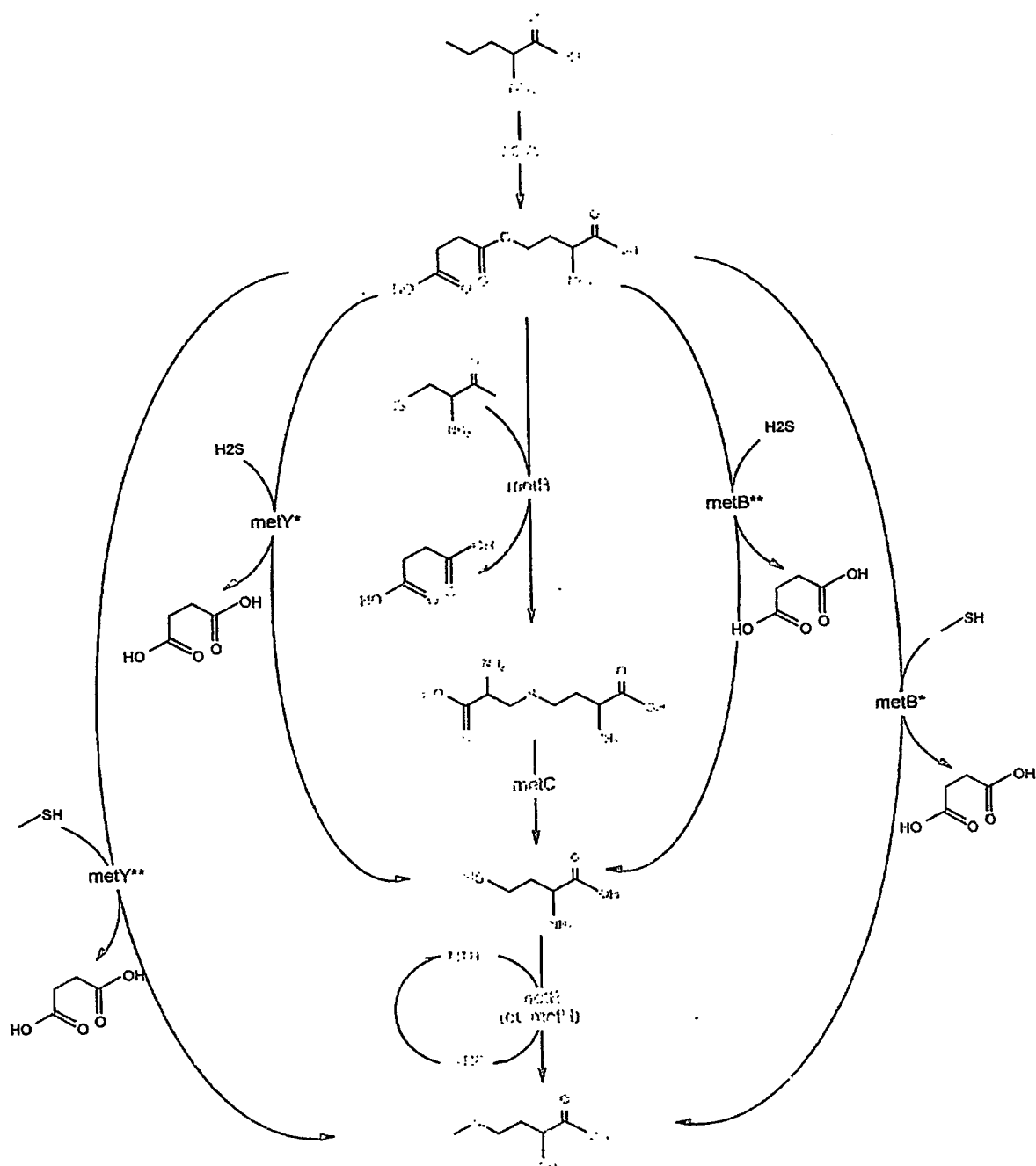


Figure 2

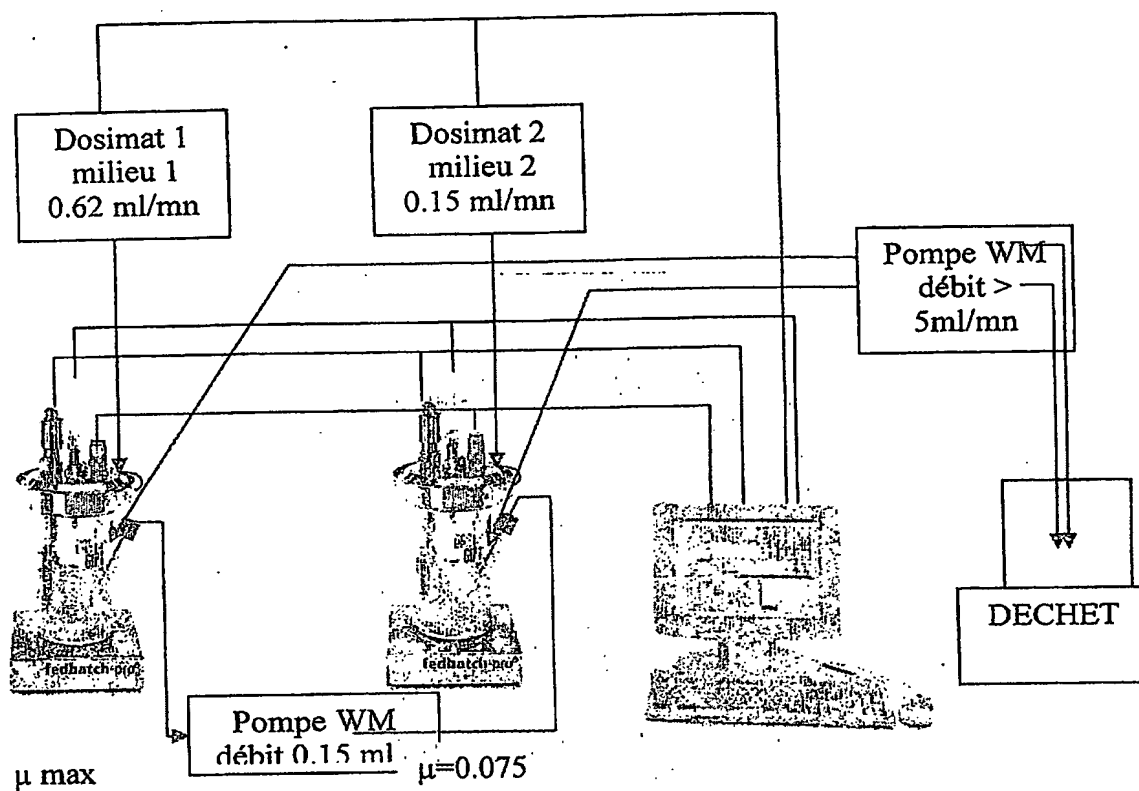


Figure 3

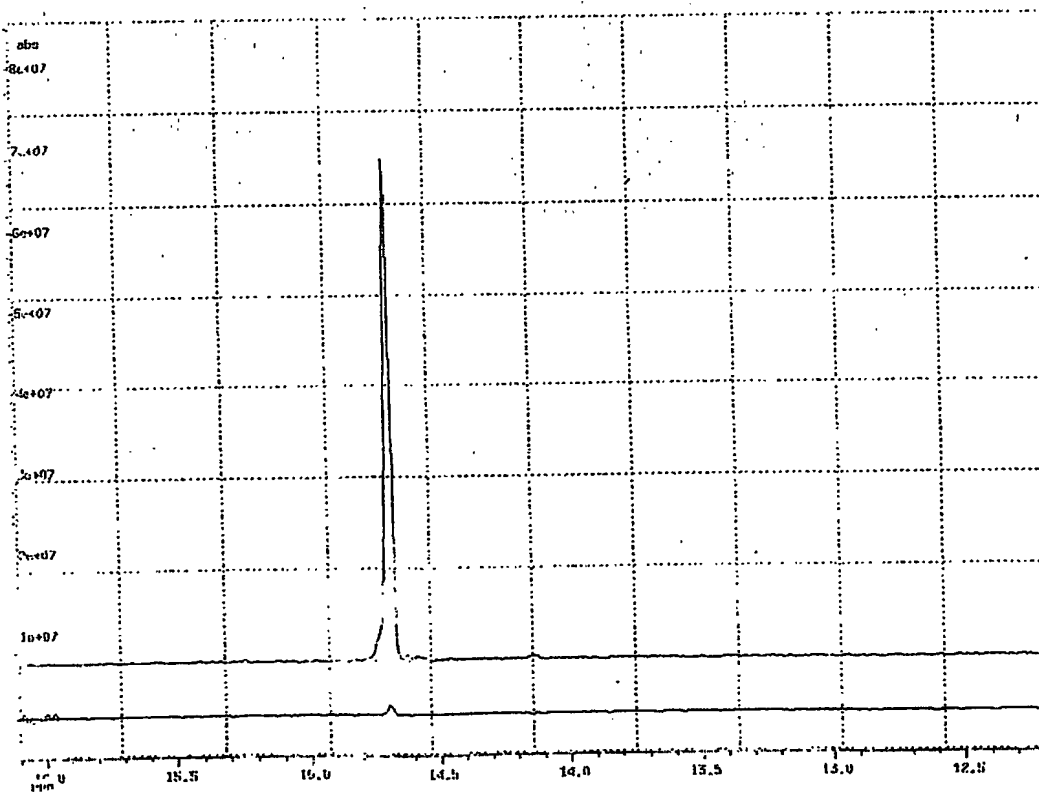


Figure 4

201
 ELIADLEG-- GVKGFAPASG LAGI---HAV F-SLIQSDH VLLGDDVYGG NFRLEFKVLV KNGLSCTI--
 Q92MW7 Q92MW7 SVIATALEEN-- GKHFAPSSG VAAI---SAV V-MLLDKGDH IILNSDVYGG TYRALTKVFT RFGLEVDV--
 NP_373671 NP_373671 ASALATEE--- GYFARAPSSG MAAS---DCA LRVMRLPGDH VIIPDDVYGG TFRLLDKVFT QMNVDYTPV-
 P46807 P46807 ENLAALLEG-- GRGLAPASG LAAB---DCL LRTLRLPGDH VVIPNDVYGG TFRLLSKAVT RWGVGWSVA-
 CAD30944 CAD30944 EQLAAVEG-- GKVALSPSSG LAAL---DVL LRSTLTKPGDH IILGNDVYGG TFRLLSKAVT RWGVGWSVA-
 NP_696324 NP_696324 EALAELEG-- GAGGVVATG TAAI---TLV LHALRLPGDH LVVPHDAYGG SWRLEFNALAK KGHFELITV-
 AAO29646 AAO29646 DALAELEG-- GAGVVTCTG MAAL---TLV T-TLLGPDLL LVVPHDAYGG SWRLEFNALAK KGHFELITV-
 NP_638204 NP_638204 EALAELEG-- GAGVVTCTG MAAL---TLV T-TLLGPDLL LVVPHDAYGG SWRLEFNALAK KGHFELITV-
 NP_719586 NP_719586 RALAELEG-- GAGAVLNTG MSAL---HLV TVVFLKPGDL LVAPHDCYGG SYRLFDSIAK RGCYRVLFV-
 NP_418374 NP_418374 RALAELEG-- GAGAVLNTG MSAL---HLV TVVFLKPGDL LVAPHDCYGG SYRLFDSIAK RGCYRVLFV-
 NP_457953 NP_457953 RALAELEG-- GAGAVLNTG MSAL---HLV TVVFLKPGDL LVAPHDCYGG SYRLFDSIAK RGCYRVLFV-
 BAC61028 BAC61028 SALAELEG-- GAGAVLNTG MSAL---HLV TVVFLKPGDL LVAPHDCYGG SYRLFDSIAK RGCYRVLFV-
 NP_126586 NP_126586 DKLAELEG-- SDNALAFSSG MSAL---STL YFSLLEGDKK VVLSMEGYCT TIEL-AKLLR KFGVDVK-L-
 KKIIVLFTN-- AEMGIATFSSG MGAI---STL ALALALKPGHS VLVRHDMFGR SYRFDTYLLK NFGVNEVA-A
 NP_343729 NP_343729 DRLAVTEG-- AESAALFSSG MSAL---ATT LFAFVRPGDV ILHSPRYLGG TETLLAKFTF NGVNEVA-A
 NP_539021 NP_539021 EYLAATES-- GYLAALFSSG MSAL---QVLA F-SVFPVGSK VLHQAQDLYGG SEFWNQVQEG EGRFHT-Y-
 NP_358970 NP_358970 RYLAEMEH-- GYLAALFSSG MSAL---QVLA F-SVFPVGSK VLHQAQDLYGG SEFWNQVQEG EGRFHT-Y-
 NP_786043 NP_786043 RAMGTLDG-- G-FAVSYSYG LAAA---TSL A-DLVFTGGT VVLPKAAIYGG VTNIFARMEA RGLKVRVTV-
 NP_601979 NP_601979 SYTRGTANLR EEDIIYLFPG MNAIFAHARA LYSIRTPPGS TPLKSNVFGF PYVDTLKILE KENPSCALFY
 EAA30199 EAA30199 Consensus g..a..f..sg m..aill..pgd.d..gg .rlf..... .k...Etps

301
 NP_LKLTIDLA QCASVAKENH L-----LTI VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 Q92MW7 Q92MW7 NP_LLRVDPDK KSAELAKBHG L-----ISV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_373671 NP_373671 NP_LSIGADIT SIGELGKHS V-----KVL VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 P46807 P46807 NP_LLGITIDIA QVAQVARDAG A-----RLV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 CAD30944 CAD30944 NP_LLNITIDIA ATTEVAHKYV T-----KVA VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_696324 NP_696324 NP_LLRITIDLG AVIERAHRVG A-----LTV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 AAO29646 AAO29646 NP_LLRITIDLR FVIERAHRVG A-----LTV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_638204 NP_638204 NP_LLRVVDIE ALAKASHGVG A-----LTV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_719586 NP_719586 NP_LLRVVDIE ALAKASHGVG A-----LTV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_418374 NP_418374 NP_LLRVVDIE ALAKASHGVG A-----LTV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_457953 NP_457953 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 BAC61028 BAC61028 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_126586 NP_126586 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_343729 NP_343729 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_539021 NP_539021 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_358970 NP_358970 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_786043 NP_786043 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 NP_601979 NP_601979 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW
 EAA30199 EAA30199 NP_LLRVVDIA KICRLAREAG A-----VSV VDNTEFATPYC QNPILLGTDI VAHNGTKYLG CHSDVAVGLV T---TNNEALA QEFDFQNAI GGVGLGQDSW

Figure 5 (Suite)

401
 Q92MW7 LLOVGIKTIG LPHEAHQKNA LCVAFLEKH PK--VERVY PGLTPHNHE LAKQMRG-- FSGMFSFTLK -NDSEAVAFV ESLEKFLGE SLGGVESLVG
 NP_373671 LVPVGIKTIG LSHQIHRSV IEIKMLQAH PA--VQOVH PSTESHLDH VMAQADG-- HTGVIAFEVK -NTESAKOLI KATSYITLAE SLGAVESLIS
 NP_46807 LTRGKIKTIV LPMORHENA ITVAEFLAGH PS--VSALVY PGLPSHPGHE VAARQMRG-- FGGWVSLMR AGRLAAODLC ARTKVFTLAE SLGGVESLIE
 CAD30944 LVLGKIKTJA VMDRHSNA TKVADMLSHQ AR--VTSVLY PGLPEHPGHE LAKQMRG-- FGGWVSLMR AGRLAAODLC ARTKVFTLAE SLGGVESLIE
 NP_696324 LDRGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGGIVSVOLA AGAEAAKHV DHTQIFTLAE SLGGVESLIA
 AAO29646 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGGIVSVOLA AGAEAAKHV DHTQIFTLAE SLGGVESLIA
 NP_638204 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGGIVSVOLA AGAEAAKHV DHTQIFTLAE SLGGVESLIA
 NP_719586 QLPGRHNA VTEHQRNA DAIVALLDH AA--VQOVH PGLASHPGA LAAQKQG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 NP_418374 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 NP_457953 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 BAC61028 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 NP_126586 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 NP_343723 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 NP_539021 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 NP_358970 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 NP_786043 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 NP_601979 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 EAA30199 LRLGKIKTLD LAYRHSNA LKVAWLESQ PSDVIRVWY PGLSEHPGHE IARQMHG-- FGMNLSFELN GGEAVRAV DGLRYFTLAE SLGGVESLVA
 Consensus 1..lgl.tl.. .sm.....na ..i...l..h p. v..v.y pgl..hp.h. .a..q..g.. fggm.sf.l. .g...a..f. .l..f.lae slgqv#sl.

562

501
 IPALMTH-CI PKQREARAGI RDGLVRLSVG IEHQDLLED LDQAFKIS
 NP_373671 QPALMTH-SI PADIRAKEGI TDGLVRLSVG IEDPEDIADD LKQALDTL
 NP_46807 QPSANTHAST TGSOLE--V PDDLVRSLVG IEDVGDLLCD LKQALN
 CAD30944 HPGRMTH-SA AGSAL--V PADLVRSLVG IENADDLLAD LQALG
 NP_696324 VPAMTHASV AGTTLQ--V PDLVRSLVG IENADDLLAD LQALDRI
 AAO29646 HPASHTH-AM TPEARAKAGI SDGLVRLSVG IEASEDLVD LVAGLGAQA VREECKV
 NP_638204 HPASHTH-AM TPEARAKAGI SDGLVRLSVG IEASEDLVD LVAGLGAQA VREECKV
 NP_719586 VPATMTH-AM TPEARAKAGI SDGLVRLSVG IEASEDLVD LVAGLGAQA VREECKV
 NP_418374 HAATMTH-AM TPEARAKAGI SDGLVRLSVG IEASEDLVD LVAGLGAQA VREECKV
 NP_457953 HAATMTH-AM TPEARAKAGI SDGLVRLSVG IEASEDLVD LVAGLGAQA VREECKV
 BAC61028 HAATMTH-AM TPEARAKAGI SDGLVRLSVG IEASEDLVD LVAGLGAQA VREECKV
 NP_126586 YPVKSAETL DEIREITLGI TDGLVRLSVG IEDVGDLLCD LKQALDRI
 NP_343723 YPVKSAETL DEIREITLGI TDGLVRLSVG IEDVGDLLCD LKQALDRI
 NP_539021 YPVKSAETL DEIREITLGI TDGLVRLSVG IEDVGDLLCD LKQALDRI
 NP_358970 YPVKSAETL DEIREITLGI TDGLVRLSVG IEDVGDLLCD LKQALDRI
 NP_786043 YPVKSAETL DEIREITLGI TDGLVRLSVG IEDVGDLLCD LKQALDRI
 NP_601979 YPVKSAETL DEIREITLGI TDGLVRLSVG IEDVGDLLCD LKQALDRI
 EAA30199 YPVKSAETL DEIREITLGI TDGLVRLSVG IEDVGDLLCD LKQALDRI
 Consensus .pa.mtha..r...g! ...L.RLSIG IE...#i.D l.qal.....

Figure 5 (fin)

[illegible]

Figure 6

NP_735969 QLFSLANVA EAKSLIH?A STHAQINEQ ELLAGVTPD LIRISVCVEN ADDLIADLQ ALACV⁴⁶⁷
 NP_712243 ELFSLANVG IAFSLVIHFA STHQQLTPE EQLSAGVTPD FVRLSVGLEN IEDILFDLEE ALKKV
 AAN68137 QLVRLANIG FAKSLACH?A STHPQLNDD ELEKAGVPRD MVRLSIGIEH SDEIADLAQ ALEASRG
 NP_593886: KLSHNLANIG DVPSLVVHFA TTTHSQSDEA GLARAGVTQS TVRLSVGIET IDDIADLEG GFRAI
 BAC46370 KLAISN?IG FAKSLVTH?A TTTHQRLKPE DRAALGISEG FIFRSAGLEH ADDLIEDLTA ALEKA
 AAC57279 RLISITANIG LITTTITHAS TWSHGRAPQ ERERAGIRDS LIRVAVGLED VADLQADLAR GLAAL
 AAA33435: RVSITITIG FTKTTIARPA TTSHGRISPE DRARAGIGDS LIRVAVGLED LODLKADMAR GLAAL
 NP_284520: EJSRTANIG LVPSTITHFW TTTHGRMQPE EKLAANIHPG LVRLSVGLEY VGLIDDLKQ ALAR
 Consensus .L.s...a:ig Baksl..HPa ttth.rl.pe e..aag!... !RLSVGLE. .ddliadl.. ala....

Figure 6 (nm)

9/10

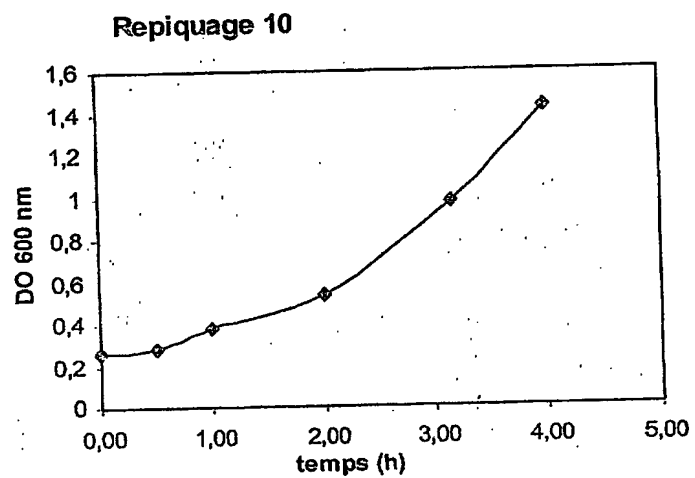
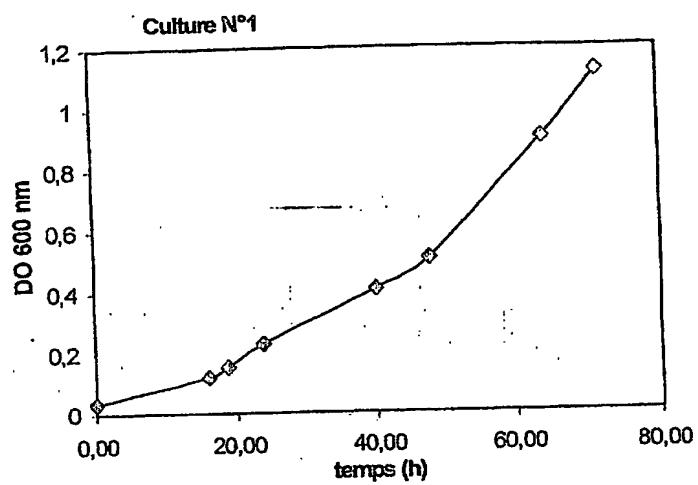


Figure 7

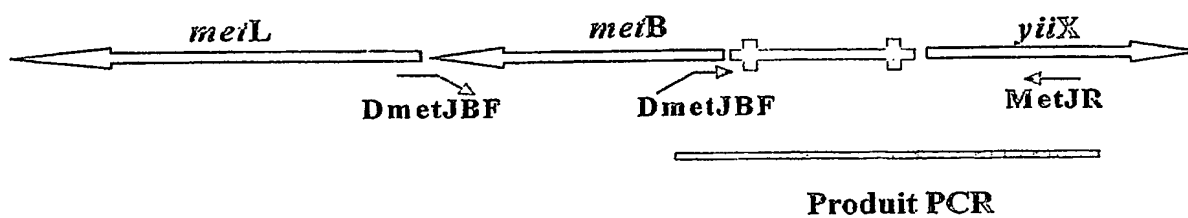


Figure 8

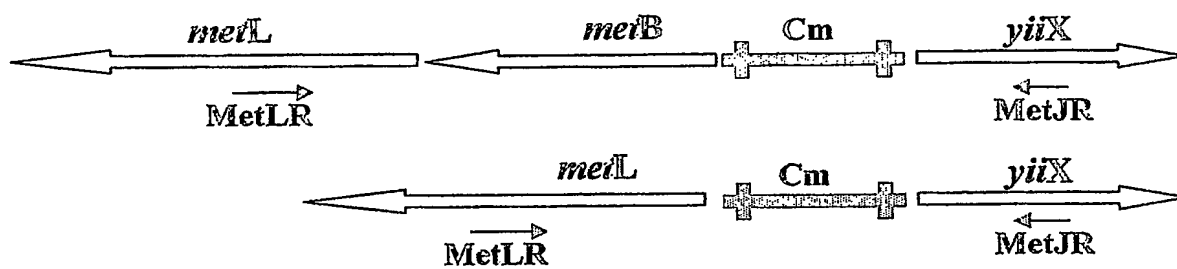


Figure 9

LISTE DE SEQUENCE

<110> Metabolic Explorer

<120> Microorganisme à activité méthionine synthase modifiée et procédé de préparation de la méthionine

<130> D21189

<150> FR 03/01 924

<151> 2003-02-18

<160> 19

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 42

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTAC-O

<400> 1

gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aa

42

<210> 2

<211> 44

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pLAC-O

<400> 2

ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tataatgtgt ggaa

44

<210> 3

<211> 43

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTRC-O

<400> 3

gagctgttga caattaatca tccggctcgt ataatgtgtg gaa

43

<210> 4

<211> 44

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Promoteur pTHLA

<400> 4

aatatattga taaataaat aatagtggtg ataattaagt tggt

<210> 5
 <211> 1161
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<220>
 <223> Séquence non mutée

<400> 5
 atgacgcgta aacaggccac catcgcagtg cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtat 60
 ggttgcggtg tcccaccgat ccatctttcc agcacctata actttaccgg atttaatgaa 120
 ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgcggc aacccaacgc gcgatgtggt tcagcgtgcg 180
 ctggcagaac tggaagggtg tgctggtgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt 240
 cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacct ggcatctgc tggttgcgcc gcacgactgc 300
 tacggcggtg gctatcgctt gttcgacagt ctggcgaaac gcggttgcta tcgctgtgtg 360
 tttgttgatc aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg 420
 gtactggtag aaagcccaag taatccattg ttacgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc 480
 catctggcaa gggaagtcgg ggcggtgagc gtggtggata acaccttctt aagcccggca 540
 ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccgat ctggtgttgc attcatgcac gaaatatctg 600
 aacggtcact cagacgtagt ggccggcggtg gtgattgcta aagaccggga cgttgtcact 660
 gaactggcct ggtgggcaaa caatattggc gtgacgggag gcgcgtttga cagctatctg 720
 ctgctacgtg ggttgcgaaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgagcgc caacgcgcag 780
 gcgattgtga aatacctgca aaccagccg ttggtgaaaa aactgtatca cccgtcgttg 840
 ccggaaaatc aggggcatga aattgccgag cgccagcaaa aaggcttttg cgcaatgttg 900
 agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcgtt tcttgggcgg gctgtcgttg 960
 tttacgctgg cggaatcatt agggggagtg gaaagtttaa tctctcacgc cgcaaccatg 1020
 acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctgccgccg ggatctccga gacgctgctg 1080
 cgtatctcca ccggtattga agatggcgaa gatttaattg ccgacctgga aaatggcttc 1140
 cgggctgcaa acaagggtgta a 1161

<210> 6
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <223> Séquence non mutée

<400> 6

Met	Thr	Arg	Lys	Gln	Ala	Thr	Ile	Ala	Val	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp
1				5					10					15	
Asp	Glu	Gln	Tyr	Gly	Cys	Val	Val	Pro	Pro	Ile	His	Leu	Ser	Ser	Thr
		20						25					30		
Tyr	Asn	Phe	Thr	Gly	Phe	Asn	Glu	Pro	Arg	Ala	His	Asp	Tyr	Ser	Arg
		35					40					45			
Arg	Gly	Asn	Pro	Thr	Arg	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu
		50				55					60				
Glu	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Val	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Met	Ser	Ala	Ile
65					70				75						80
His	Leu	Val	Thr	Thr	Val	Phe	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Leu	Leu	Val	Ala
			85						90					95	

Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
 100 105 110
 Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln
 115 120 125
 Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
 130 135 140
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys
 145 150 155 160
 His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe
 165 170 175
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val
 180 185 190
 Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala
 195 200 205
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp
 210 215 220
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln
 245 250 255
 Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val
 260 265 270
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile
 275 280 285
 Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu
 290 295 300
 Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Thr Leu Ala Glu Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His
 325 330 335
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala
 340 345 350
 Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp
 355 360 365
 Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn
 370 375 380
 Lys Gly
 385

<210> 7

<211> 1161

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Séquence mutée - souche K183

```

<400> 7
atgacgcgta aacaggccac catcgcagtg cgtagcgggt taaatgacga cgaacagtat    60
ggttgcggtt tcccaccgat ccatctttcc agcacctata actttaccgg atttaatgaa    120
ccgcgcgcgc atgattactc gcgtcgcggc aaccaacgc gcgatgtggt tcagcgtgcg    180
ctggcagaac tggaaggtgg tgctgggtgca gtacttacta ataccggcat gtccgcgatt    240
cacctggtaa cgaccgtctt tttgaaacct ggcgatctgc tggttgcgcc gcacgactgc    300
tacggcggta gctatcgctt gttcgacagt ctggcgaaaac gcggttgcta tcgcgtgttg    360
tttgttgatc aaggcgatga acaggcatta cgggcagcgc tggcagaaaa acccaaactg    420
gtactggtag aaagcccaag taatccattg ttacgcgtcg tggatattgc gaaaatctgc    480
catctggcaa gggaagtccg ggcggtgagc gtggtggata acaccttctt aagcccggca    540
ttacaaaatc cgctggcatt aggtgccgat ctggtgttgc attcatgcac gaaatatctg    600
aacggtcact cagacgtagt ggccggcggtg gtgattgcta aagaccgga cgttgtcact    660
gaactggcct ggtgggcaaa caatatgggc gtgacgggcg gcgcgtttga cagctatctg    720
ctgctacgtg ggttgcgaaac gctggtgccg cgtatggagc tggcgcagcg caacgcgcag    780
gcgattgtga aatacctgca aaccagccg ttggtgaaaa aactgtatca cccgtcgttg    840
ccggaaaatc aggggcatga aattgccgcg cgccagcaaa aaggcttttg cgcaatgttg    900
agttttgaac tggatggcga tgagcagacg ctgcgtcgtt tcctgggcgg gctgtcgttg    960
tttacgctgg cggcatcatt agggggagtg gaaagtttaa tctctcacgc cgcaaccatg   1020
acacatgcag gcatggcacc agaagcgcgt gctgccgcg ggatctccga gacgctgctg   1080
cgtatctcca ccggtattga agatggcgaa gatttaattg ccgacctgga aaatggcttc   1140
cgggctgcaa acaaggggta a                                     1161

```

<210> 8

<211> 386

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Séquence mutée - souche K183

<400> 8

```

Met Thr Arg Lys Gln Ala Thr Ile Ala Val Arg Ser Gly Leu Asn Asp
1          5          10          15

Asp Glu Gln Tyr Gly Cys Val Val Pro Pro Ile His Leu Ser Ser Thr
20          25          30

Tyr Asn Phe Thr Gly Phe Asn Glu Pro Arg Ala His Asp Tyr Ser Arg
35          40          45

Arg Gly Asn Pro Thr Arg Asp Val Val Gln Arg Ala Leu Ala Glu Leu
50          55          60

Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Leu Thr Asn Thr Gly Met Ser Ala Ile
65          70          75          80

His Leu Val Thr Thr Val Phe Leu Lys Pro Gly Asp Leu Leu Val Ala
85          90          95

Pro His Asp Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Ser Leu Ala
100          105          110

Lys Arg Gly Cys Tyr Arg Val Leu Phe Val Asp Gln Gly Asp Glu Gln

```

115 120 125
 Ala Leu Arg Ala Ala Leu Ala Glu Lys Pro Lys Leu Val Leu Val Glu
 130 135 140
 Ser Pro Ser Asn Pro Leu Leu Arg Val Val Asp Ile Ala Lys Ile Cys
 145 150 155 160
 His Leu Ala Arg Glu Val Gly Ala Val Ser Val Val Asp Asn Thr Phe
 165 170 175
 Leu Ser Pro Ala Leu Gln Asn Pro Leu Ala Leu Gly Ala Asp Leu Val
 180 185 190
 Leu His Ser Cys Thr Lys Tyr Leu Asn Gly His Ser Asp Val Val Ala
 195 200 205
 Gly Val Val Ile Ala Lys Asp Pro Asp Val Val Thr Glu Leu Ala Trp
 210 215 220
 Trp Ala Asn Asn Ile Gly Val Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ser Tyr Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Arg Gly Leu Arg Thr Leu Val Pro Arg Met Glu Leu Ala Gln
 245 250 255
 Arg Asn Ala Gln Ala Ile Val Lys Tyr Leu Gln Thr Gln Pro Leu Val
 260 265 270
 Lys Lys Leu Tyr His Pro Ser Leu Pro Glu Asn Gln Gly His Glu Ile
 275 280 285
 Ala Ala Arg Gln Gln Lys Gly Phe Gly Ala Met Leu Ser Phe Glu Leu
 290 295 300
 Asp Gly Asp Glu Gln Thr Leu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Thr Leu Ala Ala Ser Leu Gly Gly Val Glu Ser Leu Ile Ser His
 325 330 335
 Ala Ala Thr Met Thr His Ala Gly Met Ala Pro Glu Ala Arg Ala Ala
 340 345 350
 Ala Gly Ile Ser Glu Thr Leu Leu Arg Ile Ser Thr Gly Ile Glu Asp
 355 360 365
 Gly Glu Asp Leu Ile Ala Asp Leu Glu Asn Gly Phe Arg Ala Ala Asn
 370 375 380
 Lys Gly
 385

<210> 9

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DmetER

<400> 9
 taccctccgac gcaagttctg cgcgcgcctgc accatgttcg ccagtgcgcg gggggtttct 60
 ggccagcgcg gcgttttcag catatgaata tcttccttag 100

<210> 10
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Oligonucléotide DmetEF

<400> 10
 tgacaatatt gaatcacacc ctcggtttcc ctgcggttg cctgcgtcgc gagctgaaaa 60
 aagcgcaaga aagttattgg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Oligonucléotide MetER

<400> 11
 ggtttaagca gtatggtggg aagaagtcgc 30

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Oligonucléotide MetEF

<400> 12
 cccggggatg aataaacttg ccgccttccc 30

<210> 13
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Oligonucléotide DmetCR

<400> 13
 ccggcglcca gctcggaat cagatcgtcg acatcttcca gaccaalatg cagcgcgaatc 60
 aaggtcccgc taaaatgat catatgaata tcttccttag 100

<210> 14
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DmetCF

<400> 14

cggacaaaaa gcttgatact caactggtga atgcaggacg cagcaaaaaa tacactctcg 60
gcgcggtaaa tagcgtgatt tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 15

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetCR

<400> 15

cgtccgggac gccttgatcc cggacgcaac 30

<210> 16

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetCF

<400> 16

gcggtttacgc agtaaaaaag tcaccagcac gc 32

<210> 17

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DmetJBF

<400> 17

tatgcagctg acgacctttc gccctgcct gcgcaatcac actcattttt accccttggt 60
tgcagcccg aagccatttt caggcaccag agtaaacatt 100

<210> 18

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetJR

<400> 18

ggtacagaaa ccagcaggct gaggatcagc 30

<210> 19

<211> 41

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetLF

<400> 19

aaataacact tcacatcagc cagactactg ccaccaaatt t

41

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ...1/1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 26085

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240589 D20701 FT
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0305768
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) MICROORGANISME A ACTIVITÉ METHIONINE SYNTHASE MODIFIÉE ET PROCÉDE DE PRÉPARATION DE LA METHIONINE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) : METABOLIC EXPLORER : BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		CHATEAU Michel
Prénoms		
Adresse	Rue	Les Baumettes, Appt 47 - Bat E1
	Code postal et ville	63200 RIOM
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		GONZALEZ Benjamin
Prénoms		
Adresse	Rue	4, rue Sidoine Apollinaire
	Code postal et ville	63000 CLERMONT-FERRAND
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		SOUCAILLE Philippe, Noel, Paul
Prénoms		
Adresse	Rue	Chant du Coucou
	Code postal et ville	31450 DEYME
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		15 octobre 03 Franch Teter 94-1103 F. Teter

ECT/FR2004/000354



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.